

# **Funktionelle Charakterisierung von Desmocollin 2 während der Embryonalentwicklung und im adulten Herzen in der Maus**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)  
im Fach Biologie  
eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin  
von  
Diplom-Biologin Ute Rimpler

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Prof. Dr. Stefan Hecht

Gutachter: 1. Prof. Dr. Thomas Sommer  
2. Prof. Dr. Ludwig Thierfelder  
3. Prof. Dr. Silke Sperling

Tag der mündlichen Prüfung: 07.01.2014

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>4</b>
2.1 Zelladhäsion und Zellkommunikation.....	4
2.2 Desmosomen.....	5
2.2.1 Struktur und molekulare Komposition .....	5
2.2.2 Desmosomale Cadherine .....	9
2.2.3 Die adhäsive Funktion der desmosomalen Cadherine .....	11
2.2.4 Die Glanzstreifen des Herzens.....	13
2.2.5 Desmosomen in differenzierten Geweben – desmosomale Erkrankungen.....	13
2.2.5.1 Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) .....	14
2.2.5.1.1 Pathologie und Diagnostik .....	14
2.2.5.1.2 Genetik .....	15
2.2.5.1.3 Molekulare Pathogenese.....	16
2.2.6 Rolle von desmosomalen Cadherinen in Signaltransduktionswegen.....	17
2.2.7 Desmosomale Proteine in der Embryonalentwicklung.....	18
<b>3. Zielstellung.....</b>	<b>21</b>
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>22</b>
4.1 Generierung einer Desmocollin 2-defizienten Mauslinie.....	22
4.2 Analyse des pränatalen Phänotyps der Dsc2 <sup>-/-</sup> -Tiere.....	24
4.3 Analyse des postnatalen Phänotyps der Dsc2 <sup>-/-</sup> -Tiere .....	25
4.3.1 Unveränderte Herzfunktion und Herzmorphologie in Dsc2 <sup>-/-</sup> -Tieren.....	26
4.3.2 Aufrechterhaltung der molekularen Komposition und ultrastrukturellen Organisation der Desmosomen Dsc2-defizienter Herzen.....	27
4.3.3 Analyse möglicher Kompensationsmechanismen in Dsc2-defizienten Mäusen.....	30
4.4 Analyse der Dsc2-defizienten Tiere unter Belastungsbedingungen .....	32
4.4.1 Angiotensin II (Ang II)–Belastungsmodell .....	32
4.4.1.1 Pathologischer Herzphänotyp Dsc2 <sup>-/-</sup> -Mäuse .....	32
4.4.1.2 Myokardiale Fibrose und erhöhte Expression von Hypertrophie-markern.....	34
4.4.1.3 Die Zellverbindungen in den Glanzstreifen der Kardiomyozyten – Internalisation von Cx43 .....	36
4.4.1.4 Aufrechterhaltung der zellulären Integrität Dsc2 <sup>-/-</sup> -Kardiomyozyten.....	40
4.4.1.5 Keine Veränderungen in klassischen Hypertrophie-assoziierten Signalwegen.....	41
4.4.2 Thorakales Aortenbanding (TAC).....	42

4.4.2.1	Pathologischer Herzphänotyp in Dsc2 <sup>-/-</sup> -Tieren .....	42
4.4.2.2	Elektrophysiologische Veränderungen der Dsc2 <sup>-/-</sup> -Herzen .....	46
4.4.2.3	Myokardiale Fibrosierung und erhöhte Expression von Hypertrophie markern ....	47
4.4.2.4	Die Zellverbindungen in den Glanzstreifen der Kardiomyozyten – Internalisation von Cx43 .....	51
4.4.2.5	Aufrechterhaltung der zellulären Integrität Dsc2 <sup>-/-</sup> -Kardiomyozyten unter chronischer Druckbelastung .....	55
4.4.2.6	Keine Veränderungen in Hypertrophie-assoziierten Signalwegen .....	56
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>58</b>
5.1	Desmocollin 2 ist nicht essentiell für die pränatale Entwicklung .....	59
5.2	Dsc2 ist nicht essentiell für die postnatale Entwicklung und die Desmosomenbildung .....	60
5.3	Die mutmaßlich verminderte Adhäsivität Dsc2-defizienter Desmosomen .....	63
5.4	Dsc2 ist für die Aufrechterhaltung der kardialen Funktion unter Belastungsbedingungen essentiell .....	66
5.5	Das Dsc2-Knockout-Modell im Vergleich zu anderen Tiermodellen desmosomaler Proteine .....	67
5.6	Die Rolle von Dsc2 in Signalwegen .....	69
<b>6.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>72</b>
6.1	Material .....	72
6.1.1	Enzyme .....	72
6.1.2	Plasmide .....	72
6.1.3	BAC-Klone .....	72
6.1.4	Bakterienstämme .....	72
6.1.5	Zelllinien .....	73
6.1.6	Oligonukleotide .....	73
6.1.6.1	Genotypisierungsprimer .....	73
6.1.6.2	Primer für Klonierungs-PCR .....	73
6.1.6.3	Sequenzierungsprimer .....	74
6.1.6.4	Primer für die Real-time PCR .....	75
6.1.7	Antikörper .....	75
6.1.8	Kits .....	76
6.1.9	Puffer & Lösungen .....	76
6.1.10	Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	77
6.1.11	Software .....	78
6.2	Methoden .....	79
6.2.1	Mikrobiologische Arbeitstechniken .....	79
6.2.1.1	Herstellung elektrokompenter Zellen .....	79

6.2.1.2	Transformation von Bakterien mittels Elektroporation.....	79
6.2.2	DNA-Arbeitstechniken .....	80
6.2.2.1	Agarose-Gelelektrophorese .....	80
6.2.2.2	Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	80
6.2.2.3	Isolierung genomischer DNA aus murinen ES-Zellklonen.....	80
6.2.2.4	Natriumchlorid-Extraktion genomischer DNA .....	80
6.2.2.5	Isolierung bakterieller DNA.....	81
6.2.2.6	Konzentrationsbestimmung von DNA .....	81
6.2.2.7	DNA-Sequenzierung.....	81
6.2.2.8	DNA-Restriktion .....	82
6.2.2.9	DNA-Ligation .....	82
6.2.2.10	Genotypisierung .....	82
6.2.2.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	83
6.2.2.12	Southern Blot .....	84
6.2.2.13	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden.....	84
6.2.3	RNA-Arbeitstechniken .....	85
6.2.3.1	RNA-Extraktion aus murinem Gewebe .....	85
6.2.3.2	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	85
6.2.3.3	Reverse Transkription .....	85
6.2.3.4	Quantitative Real-time PCR.....	86
6.2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	87
6.2.4.1	Gesamtproteinextraktion aus murinem Gewebe .....	87
6.2.4.2	Proteinkonzentrationsmessung nach Lowry.....	87
6.2.4.3	Western Blot .....	88
6.2.5	Histologische Methoden .....	89
6.2.5.1	Paraffineinbettung .....	89
6.2.5.2	Kryoeinbettung.....	89
6.2.5.3	Histochemie .....	90
6.2.5.3.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) .....	90
6.2.5.3.2	Sirius Red-Färbung.....	90
6.2.5.3.3	Quantifizierung der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche.....	91
6.2.5.4	Immunfluoreszenzfärbung .....	91
6.2.5.5	TUNEL-Assay .....	92
6.2.6	Elektronenmikroskopie.....	92
6.2.7	Tierversuche .....	92
6.2.7.1	Generierung der Dsc2 Knockout-Mauslinie.....	92
6.2.7.1.1	Herstellung des Targeting-Vektors.....	94
6.2.7.1.2	Elektroporation muriner, embryonaler Stammzellen .....	95
6.2.7.2	Angiotensin II-Applikation .....	96
6.2.7.3	Operative Aortenkonstriktion (TAC) .....	96

## Inhaltsverzeichnis

---

6.2.7.4	Echokardiographie .....	97
6.2.7.5	Elektrokardiographie (EKG) .....	97
6.2.7.6	EBD-Injektion .....	98
6.2.7.7	Präparation .....	98
6.2.8	Statistik .....	99
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>100</b>
<b>8.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>111</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>115</b>
	<b>Erklärung.....</b>	<b>116</b>

## 1. Zusammenfassung

Desmosomen sind hochorganisierte Zell-Zell-Verbindungen. Aufgrund ihrer hohen Adhäsivität sind sie für die mechanische Kopplung und strukturelle Stabilität stark beanspruchter Gewebe von essentieller Bedeutung. Die adhäsive interzelluläre Kernstruktur der Desmosomen wird durch die transmembranen Cadherine des Desmocollin und Desmoglein-Typs gebildet. Deren extrazelluläre Domänen stellen den Kontakt zwischen zwei benachbarten Zellen her, während ihre carboxyterminalen Regionen die Organisation der zytoplasmatischen Plaque-Komponenten vermitteln. Bereits im sich entwickelnden Embryo wird die erstmalige Bildung reifer Desmosomen im 32-Zellstadium vermutlich durch das gleichzeitige Auftreten der desmosomalen Cadherine bestimmt. Im adulten Organismus ist Desmocollin 2 (Dsc2) neben Desmoglein 2 (Dsg2) die prädominante Isoform und wird in allen Desmosomen-bildenden Geweben wie auch dem Herzen exprimiert.

Ziel der Arbeit war es, die Rolle von Dsc2 bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der desmosomalen Adhäsivität und Gewebeintegrität zu untersuchen. Hierfür wurde ein klassisches Knockout-Mausmodell für Dsc2 etabliert und sowohl basal als auch unter Belastungsbedingungen charakterisiert. Unsere Daten demonstrieren, dass der ubiquitäre Knockout keinen Einfluss auf die Morphogenese des Embryos und die postnatale Entwicklung hat. Dsc2<sup>-/-</sup>-Mäuse waren lebensfähig und wiesen keinen pathologischen Phänotyp auf. Zudem ließen sich in den Herzen adulter Tiere strukturell unveränderte Desmosomen nachweisen, deren elektronenmikroskopisches Erscheinungsbild durch einen typischen hochorganisierten Aufbau gekennzeichnet war. Dahingegen konnte eine verminderte mechanische Beanspruchbarkeit der Dsc2<sup>-/-</sup>-Herzen aufgezeigt werden. Unter erhöhter Belastung zeigte sich bereits nach wenigen Tagen eine signifikante Reduktion der kardialen Funktion. Wie Expressionsstudien klassischer und desmosomaler Cadherine ergaben, wird das Fehlen von Desmocollin 2 dabei weder im Herzen noch in der Haut durch andere Adhäsionsmoleküle kompensiert. Dies lässt auf die Ausbildung transzellulärer Dsg2-Dimere in den Dsc2<sup>-/-</sup>-Desmosomen schließen. Die beobachtete kardiale Dysfunktion belasteter Dsc2<sup>-/-</sup>-Tiere ist daher vermutlich die direkte Folge einer verminderten desmosomalen Adhäsivität, hervorgerufen durch die schwächere Affinität der homophilen trans-Bindungen. Die vorliegende Arbeit zeigt somit erstmalig *in vivo*, dass Dsc2 entgegen der Lehrmeinung nicht essentiell für die Embryonalentwicklung

und die Bildung strukturell intakter Desmosomen ist. Anhand des Funktionsverlustes der adulten Knockout-Herzen unter Belastungsbedingungen lässt sich jedoch eine mögliche Rolle von Dsc2 für die Adhäsivität der Desmosomen postulieren.

## Summary

Desmosomes are highly organized adhesive intercellular junctions providing mechanical strength and structural stability to several tissues such as skin and heart. The adhesive core of desmosomes is formed by the transmembrane glycoproteins desmocollins (Dsc) and desmogleins (Dsg) which link neighbouring cells via interaction with their extracellular cadherin domains, while their intracellular portions interact with the cytoplasmic plaque components. In the developing embryo the relatively late appearance of desmosomal cadherins at the 32-cell stage coincident with the first formation of desmosomes is thought to be a key regulator of desmosome assembly. In the adult animal, desmocollin 2 and desmoglein 2 are the predominant isoforms ubiquitously expressed in all desmosome bearing tissues including the heart. To elucidate the role of Dsc2 for establishment and maintenance of desmosome adhesion and tissue integrity, we generated a constitutive knockout model of the mouse. The effect of gene inactivation was characterized under basal as well as under stress conditions, using two different stress models. Our data demonstrate that Dsc2 is not required for pre- and postnatal development. Dsc2<sup>-/-</sup> mice were viable and showed no pathological alterations at embryonic or adult stages. Consistently, Dsc2 deficient cardiomyocytes exhibited distinct and ultrastructural well organized desmosomes. However, mutant hearts displayed a decreased stress resistance. Increased mechanical pressure led to a significant reduction of cardiac function in Dsc2<sup>-/-</sup> animals. As observed by expression studies, the early loss of Dsc2 did not result in a compensatory upregulation of alternative adhesion molecules. This suggests that the transcellular link in Dsc2<sup>-/-</sup> desmosomes is mediated by the formation of isoformspecific Dsg2 dimers. Hence, cardiac dysfunction of Dsc2<sup>-/-</sup> animals may be the direct consequence of a decreased desmosomal adhesion, due to the reduced affinity of homophilic trans-interactions between Dsg2 molecules. In summary, our results demonstrate for the first time *in vivo* that Dsc2 is not essential for embryonic development and for the establishment and maintenance of distinct and well organized desmosomes. However, the reduced cardiac function in stressed knockout-mice suggests a crucial importance of Dsc2 for desmosomal adhesive strength.



## 2. Einleitung

### 2.1 Zelladhäsion und Zellkommunikation

Die Differenzierung von Zellen und damit die Spezialisierung von Geweben zu Organen ist eine Grundvoraussetzung für die Entstehung von komplexen, mehrzelligen Organismen. Von essentieller Bedeutung sind dabei die interzelluläre Kommunikation und der Zusammenhalt im Zellverband. Die funktionelle Einheit der Zelladhäsion sind die Zellverbindungen. Da sie das Zytoskelett benachbarter Zellen miteinander vernetzen, üben sie eine strukturgebende Funktion aus und bedingen so die Integrität und die mechanische Widerstandsfähigkeit eines Gewebes. Die Spezifität der Zellverbindungen wird im Wesentlichen durch transmembrane Adhäsionsmoleküle (auch: Adhäsionsrezeptor) bestimmt. Über ihre extrazellulären Domänen stellen diese den Kontakt zu Gegenrezeptoren oder zu Bestandteilen der extrazellulären Matrix (ECM), wie Fibronectin, Kollagen oder Laminin her. Klassischerweise werden die Adhäsionsmoleküle fünf Klassen zugeordnet: den Integrinen, Cadherinen, Immunglobulinen, Selektinen, sowie den Proteoglykanen (Gumbiner, 1996). Dabei bilden die Mitglieder der Integrin-, Cadherin-, Immunglobulin- und Selektin-Familie Zell-Zell-Kontakte aus. Die Interaktion mit der umgebenden extrazellulären Matrix hingegen, wird überwiegend durch die Integrine, aber auch durch die Gruppe der Oberflächen-Proteoglykane vermittelt. Ein besonders wichtiger Vertreter der Zell-ECM-Verbindungen ist der Dystrophin-Glykoprotein-Komplex (DGC). Der DGC stellt eine spezialisierte Adhäsionsstruktur der Muskelzellen dar, die das Aktin-Zytoskelett mit dem ECM-Protein Laminin verankert. Die Anbindung von F-Aktin erfolgt hierbei über das zytoplasmatische Dystrophin, welches direkt mit dem Zelladhäsionsrezeptor Dystroglykan interagiert. Die biologische Relevanz des DGC für die Aufrechterhaltung der mechanischen Integrität des Sarkolemmes zeigt sich u.a. in der, durch Mutationen im Dystrophin-Gen hervorgerufenen, Duchenneschen Muskeldystrophie (Campbell, 1995).

Die Zell-Zell-Verbindungen werden entsprechend ihrer Funktion in Verschlusskontakte (occluding junctions), Kommunikationskontakte (Gap junctions) und Adhäsionskontakte (anchoring junctions) unterschieden. Über die Zell-Zell-Kanäle der Gap junctions findet die metabolische und insbesondere auch die elektrische Kopplung der Zellen statt, wobei sie den Austausch von bis zu 1 kDa

großen Molekülen ermöglichen. Die Grundbausteine der Gap junctions sind die Connexine. Im Herzmuskel ist Connexin 43 das am stärksten exprimierte Connexin (Delmar, 2004; Goodenough, 1996). Die Bildung, Aktivität und Stabilität membranständiger Gap junctions unterliegt einer posttranslationalen Modifikation. Insbesondere für Cx43 konnten mehrere Phosphorylierungsstellen beschrieben werden, die in direktem Zusammenhang mit der Aggregation der Connexin-Moleküle zu einem Proteinkanal, dem Einbau in die Plasmamembran und der Kanalpermeabilität stehen (Delmar, 2009; Musil, 1991).

In Vertebraten existieren zwei Typen von Adhäsionskontakten, die Adhärenzverbindungen und die Desmosomen. Obwohl sie funktionell eng zusammenarbeiten um Zellen miteinander zu vernetzen und zu stabilisieren, unterscheiden sie sich in ihrem molekularen Aufbau.

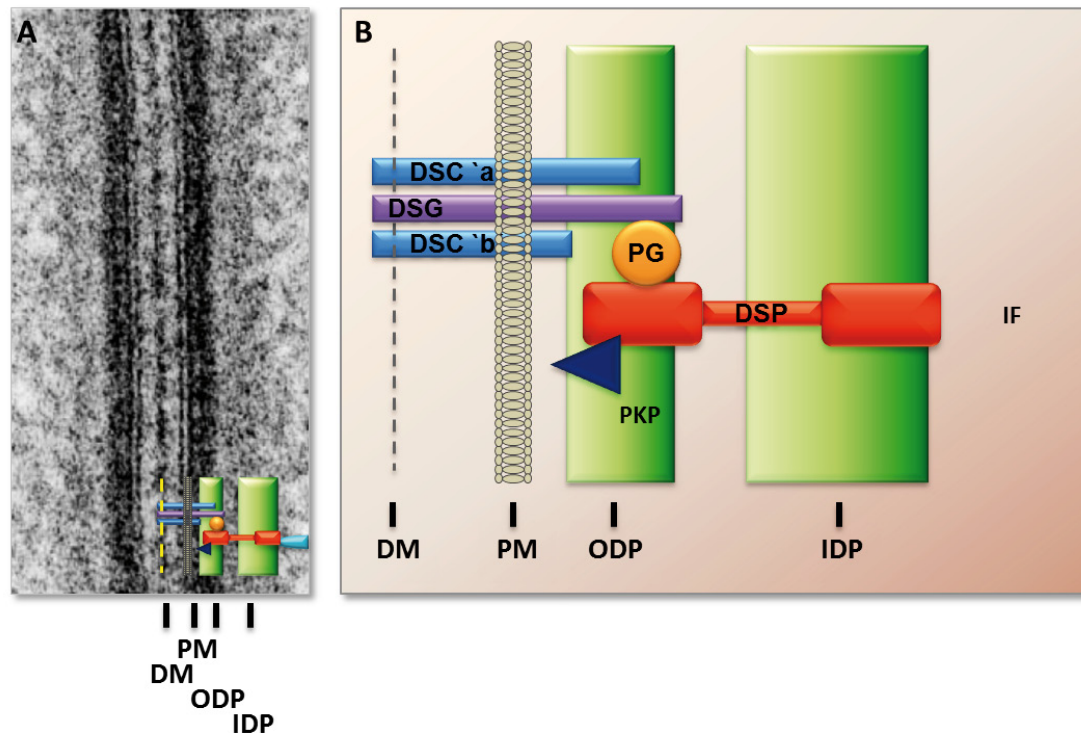
## 2.2 Desmosomen

### 2.2.1 Struktur und molekulare Komposition

Von den zahlreichen interzellulären Adhäsionsverbindungen zeichnen sich insbesondere die Desmosomen (*maculae adhaerentes*) durch eine hohe Adhäsivität aus. Sie kommen überwiegend in mechanisch stark beanspruchten Geweben wie der Epidermis oder dem Myokardium vor, weshalb ihnen eine primär stabilisierende Funktion zugeschrieben wird. Indem sie das Intermediärfilament-Zytoskelett zweier benachbarter Zellen miteinander verbinden, sorgen sie für einen starken strukturellen Zusammenhalt und für die Aufrechterhaltung der zellulären Integrität.

Im elektronenmikroskopischen Bild erscheinen die Desmosomen als hochorganisierte, elektronendichte Strukturen, deren Durchmesser 0,1-0,5 µm beträgt. Sie sind von scheibenförmiger Gestalt und bestehen aus einer extrazellulären Kern-Domäne, der Desmoglea, sowie aus zwei intrazellulären, beiderseits der Plasmamembran symmetrisch angeordneten Plaques (Abb. 1A) (Cowin, 1985). Jeder Plaque ist aufgrund einer unterschiedlichen Elektronendichte in zwei Bereiche unterteilt. Ein innerer, weniger dichter Plaque (IDP) grenzt an das Intermediärfilament-Netzwerk der Zelle. Die äußeren, elektronendichteren Plaques (ODP) werden durch die Desmoglea voneinander getrennt. Im Bereich der Desmoglea nähern sich die Plasmamembranen zweier benachbarter Zellen auf etwa 30 nm an. In reifen

Desmosomen ist innerhalb dieses Interzellularraumes eine markante Mittellinie erkennbar, welche die adhäsive Schnittstelle der desmosomalen Haftkomplexe repräsentiert (Al-Amoudi, 2004; Holthöfer, 2007).



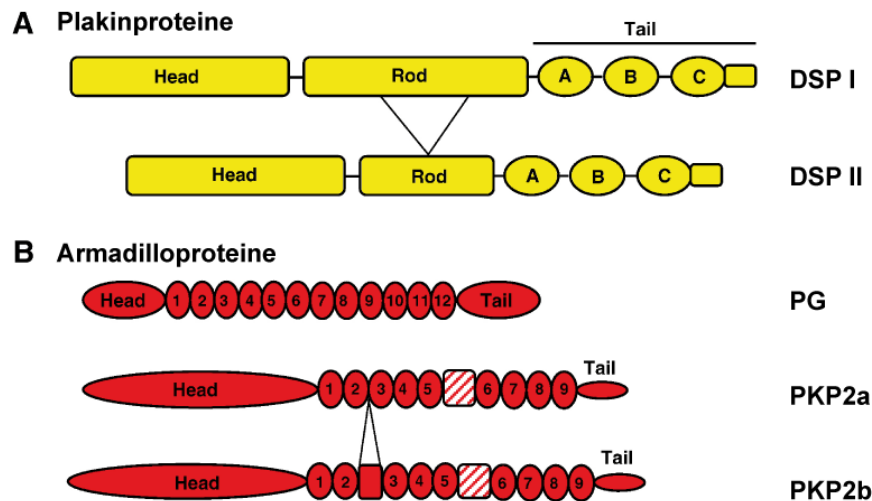
**Abb. 1: Struktureller Aufbau der Desmosomen.** Desmosomen weisen eine hochorganisierte elektronendichte Ultrastruktur auf (A). Sie bestehen aus einer elektronendichten Mittellinie (DM), sowie aus jeweils einem intrazellulären äußeren (ODP) und inneren Plaque (IDP) beiderseits der Plasmamembran (PM). Die molekulare Zusammensetzung ist grafisch illustriert (B) und schematisch im elektronenmikroskopischen Bild (A) dargestellt. Die transmembranen desmosomalen Cadherine Desmocollin (DSC) und Desmoglein (DSG) gehen im Interzellularraum adhäsive Bindungen ein. Über ihren C-Terminus findet die Interaktion mit den Plakophilinen (PKP) und Plakoglobin (PG) statt. Die Verankerung der Intermediärfilamente (IF) mit den Desmosomen erfolgt über Desmoplakin, welches mit den Armadilloproteinen (PKP, PG) im ODP interagiert (Modifiziert nach Getsios, 2004).

Die Größe und die molekulare Komposition der Desmosomen unterscheiden sich in verschiedenen Geweben und Differenzierungsstadien. Die Grundkomponenten sind jedoch immer gleich und lassen sich drei Proteinfamilien zuordnen: den Plakinen, der Armadilloproteinfamilie und den Cadherinen (Abb. 1B). Die desmosomalen Cadherine sind transmembrane Glykoproteine, welche die Adhäsionsmoleküle des Desmosoms darstellen. Im Gegensatz zu den Adhärenzverbindungen besitzen die Desmosomen zwei Untergruppen der Cadherine, die Desmocolline (DSC1-3)

(Kawamura, 1994) und die Desmogleine (DSG1-4) (Schäfer, 1994). Die glykosylierten N-terminalen Domänen der Desmocolline und Desmogleine ragen in den extrazellulären Bereich der Desmosomen hinein. Dort bilden sie homophile (DSC/DSC) und heterophile (DSC/DSG) cis- und trans-Dimere aus und formen so die Mittellinie der Desmoglea (Getsios, 2004). Über ihre in den äußeren Plaques liegenden C-Termini, sind die desmosomalen Cadherine direkt mit den Mitgliedern der Armadilloproteinfamilie Plakoglobin (PG) (Franke, 1989) und Plakophilin (PKP1-3) (Mertens, 1996; Schmidt, 1999) verbunden. Die Armadilloproteine stellen wichtige strukturelle Komponenten der Desmosomen dar, da sie als sogenannte Linkerproteine die Interaktion von Desmoplakin mit den desmosomalen Cadherinen vermitteln. Sie sind durch eine für alle Armadilloproteine kennzeichnende zentrale arm repeat Domäne charakterisiert, welche aus einer variablen Anzahl eines 42 Aminosäure langen Wiederholungsmotivs zusammengesetzt ist. Plakoglobin (MW 86 kDa), auch bekannt unter der Bezeichnung  $\gamma$ -Catenin, besitzt 12 Armadillo-Wiederholungen (Abb. 2B) (Chitaev, 1996; Witcher, 1996). Es ist als einziges desmosomales Protein ein konstitutiver Bestandteil sowohl der Desmosomen, als auch der Adhärenzverbindungen (Cowin, 1986). In den Adhärenzverbindungen fungiert Plakoglobin als Bindeglied zwischen den klassischen Cadherinen und dem Aktin-Zytoskelett. Die Bindungsaffinität von Plakoglobin zu N- bzw. E-Cadherin ist jedoch weitaus geringer als zu den desmosomalen Cadherinen. Dabei konnte die stärkste Interaktion zwischen Plakoglobin und Desmoglein und eine etwas schwächere Assoziation zu Desmocollin nachgewiesen werden (Chitaev, 1996). Die ebenfalls zu den Armadilloproteinen gehörende Gruppe der Plakophiline sind als einzige „Junction“-Proteine basisch. Sie enthalten 9 Armadillo-Motive, die von einem langen N-Terminus mit einer konservierten Head-Domäne (homology region, HR) und einem kurzen C-Terminus begrenzt werden (Abb. 2B) (Choi, 2005; Hatzfeld, 2006). Die Plakophilinfamilie umfasst 3 Mitglieder (PKP1-3) mit insgesamt 5 Spleißvarianten. Von PKP1 und PKP2 existieren jeweils eine kürzere „a“-Form und eine längere „b“-Form, die sich durch die Insertion von 21 Aminosäuren zwischen Armadillo-Motiv 3 und 4 (PKP1) bzw. von 44 Aminosäuren zwischen Motiv 2 und 3 (PKP2) unterscheiden (Mertens, 1996; Schmidt, 1997). Alle drei Plakophiline weisen ein gewebespezifisches und differenzierungsabhängiges Expressionsmuster auf, wobei PKP2 (MW: 97 kDa) das am weitesten verbreitete Plakophilin ist. Es kommt in den Desmosomen einfacher Epithelien, der Basalschicht mehrschichtiger Epithelien, aber

auch in Geweben wie den Lymphknoten, der Leber oder dem Herzmuskel vor (Mertens, 1996; Mertens, 1999). PKP1 und PKP3 hingegen, werden überwiegend epithelial exprimiert. Während PKP1 suprabasal, hauptsächlich in den Desmosomen der Körner- und Stachelschicht mehrschichtiger Epithelien zu finden ist, ist PKP3 auch ein Bestandteil der Desmosomen einfacher epithelialer Gewebe. In komplexen Epithelien wie der Epidermis, zeigt PKP3 eine einheitliche Expression und ist in allen Zellschichten gleich stark vertreten (Schmidt, 1997; Schmidt, 1999).

Sowohl die Plakophiline als auch Plakoglobin sind mit den im äußeren und inneren Plaque liegenden Plakinen assoziiert, welche die Anbindung der Intermediärfilamente an den transmembranen Komplex vermitteln. Von den in Desmosomen vorkommenden Plakinproteinen (Desmoplakin, Envoplakin, Periplakin und Plectin), ist Desmoplakin (DSP) ein konstitutiver Bestandteil aller Desmosomen. Es ist essentiell für die Formation dieser adhäsiven Zellverbindungen und für die Organisation des Zytoskeletts. Desmoplakin wird in zwei Spleißformen exprimiert, DSPI (MW 250 kDa) und DSPII (MW 215 kDa). Beide Isoformen liegen als Homodimere vor und bestehen aus N-terminal gelegenen globulären Kopf- oder Plakindomänen, jeweils einem globulären C-Terminus mit drei Plakin-Wiederholungen, sowie zentralen Coiled-coil Regionen (ROD-Domäne) von unterschiedlicher Länge (Abb. 2A) (O'Keefe, 1989). Die globuläre Domäne des N-Terminus bindet an die Armadilloproteine Plakophilin und Plakoglobin, wohingegen der aus drei Plakin-repeats bestehende C-Terminus mit den Intermediärfilamenten interagiert (Kouklis, 1994). Je nach Zelltyp sind so Keratinfilamente (epitheliale Zellen), Desminfilamente (Kardiomyozyten) oder Vimentin-Intermediärfilamente (mesenchymale Zellen) mit den Desmosomen verbunden.



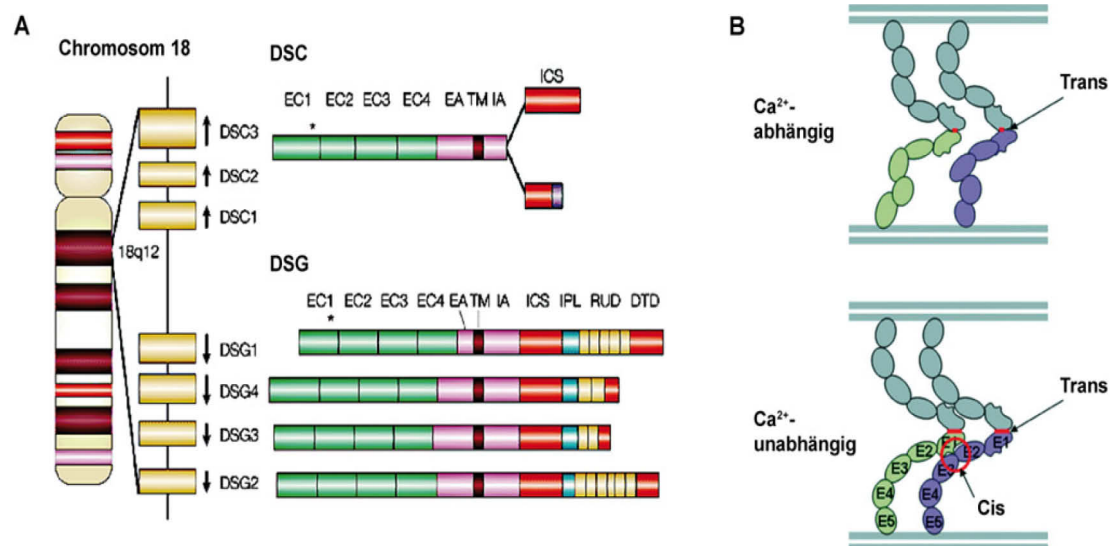
**Abb. 2: Schematische Struktur der desmosomalen Plaque-Proteine.** A) Plakinproteine. Dargestellt sind die zwei Isoformen von Desmoplakin (DSPI und DSPII), welches ein konstitutiver Bestandteil aller Desmosomen ist. DSP besteht aus drei Domänen: einer N-terminal gelegenen globulären Kopf- oder Plakindomäne, einem globulären C-Terminus, sowie einer zentralen Coiled-coil bzw. Rod-Region von unterschiedlicher Länge. A, B, C kennzeichnen die Plakin-Wiederholungsdomänen des C-Terminus. B) Armadilloproteine. Die Armadillofamilie desmosomaler Proteine besteht aus Plakoglobin (PG) und den Plakophilinen (PKP). PG besitzt 12 Armadillo-Motive, die Plakophilinen hingegen weisen 9 Wiederholungsdomänen auf. Die zwei Isoformen von PKP2 (PKP2a und PKP2b) unterscheiden sich durch die Insertion von 44 Aminosäuren zwischen Motiv 2 und 3 (Modifiziert nach Garrod, 2008).

### 2.2.2 Desmosomale Cadherine

Die desmosomalen Cadherine sind transmembrane Glykoproteine und gehören zur Cadherin-Superfamilie von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Zell-Zell-Adhäsionsproteinen. Als integrale Membranproteine des Desmosoms üben sie eine duale Funktion aus: zum einen stellen sie den adhäsiven Kontakt zwischen zwei benachbarten Zellen her, zum anderen vermitteln sie die Organisation der angrenzenden Plaque-Proteine.

Insgesamt werden sieben humane desmosomale Cadherin-Gene unterschieden. DSC1, DSC2 (MW 120 kDa) und DSC3 für Desmocollin, sowie DSG1, DSG2 (MW 160 kDa), DSG3 und DSG4 für Desmoglein, welche alle auf dem langen Arm des Chromosoms 18 lokalisiert sind (Abb. 3A) (Nollet, 2000; Hunt, 1999). Jedes der drei Desmocollin-Gene kodiert zwei alternative Spleißvarianten, wobei sich Desmocollin a von Desmocollin b lediglich durch eine längere carboxyterminale Region unterscheidet (Parker, 1991). Die desmosomalen Cadherine weisen ca. 50% Homologie zu den klassischen Cadherinen auf. Beide Cadherin-Typen haben vier

hochkonservierte extrazelluläre Cadherin-Motive (EC1-4) und eine etwas variabelere extrazelluläre Ankerdomäne (EA) gemeinsam (Huber, 2003). Die EC-Domänen werden dabei über flexible Linker verbunden, die als Bindestelle für bis zu jeweils drei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen dienen (Overduin, 1995). Entgegen der strukturellen Ähnlichkeiten in ihren extrazellulären Domänen, unterscheiden sich die Desmocolline und Desmogleine signifikant in ihren zytoplasmatischen Abschnitten. Die Mitglieder der Desmoglein-Familie bestehen intrazellulär aus einer zytoplasmatischen Ankerdomäne (IA) und einer Cadherin-ähnlichen Sequenz (ICS), an die sich eine prolinreiche Verbindungsdomäne (intracellular proline rich linker, IPL), eine Wiederholungsdomäne (repeat unit domain, RUD) sowie eine Desmoglein-Terminaldomäne (DTD) anschließen (Garrod, 2002). Der C-Terminus der Desmocolline hingegen ist kürzer als der der Desmogleine. Beide Spleißvarianten, Desmocollin a und b, besitzen eine intrazelluläre Ankerdomäne. Jedoch nur die a-Form enthält zusätzlich die Cadherin-ähnliche Sequenz, über welche die Interaktion mit dem Plaque-Protein Plakoglobin erfolgt. Aufgrund des in Desmocollin b fehlenden 72 Aminosäure langen Sequenzmotivs, kann diese Spleißform im Gegensatz zu den Desmogleinen und Desmocollin a nicht an Plakoglobin binden (Holthöfer, 2007; Troyanovsky, 1993; Troyanovsky, 1994). Diese Unterschiede deuten darauf hin, dass die desmosomalen Cadherine aus einem gemeinsamen Vorläufermolekül hervorgegangen sind, aus dem sich entsprechend ihrer spezifischen Funktion zwei separate Subtypen entwickelt haben. Dementsprechend zeigen die Cadherin-Isoformen ein zell- und entwicklungsspezifisches Expressionsmuster. DSC2 und DSG2 kommen in allen Desmosomen-reichen Geweben, wie Epidermis, Zunge, Tonsillen, Lymphknoten, Luftröhre, Speicheldrüse, Magen, Darm, Niere, Blase, Leber, Milz und auch dem Herzmuskel vor. Die Expression der anderen Isoformen ist weitgehend auf mehrschichtige Epithelien beschränkt. In der Epidermis werden alle sieben desmosomalen Cadherine zellschichtspezifisch gebildet. DSC2/3 und DSG2/3 in der Basalschicht, DSC1, DSG1 sowie DSG4 in der Körner- und Stachelschicht (Koch, 1992; Nuber, 1995; Schafer, 1994). Die genaue Funktion der einzelnen Cadherin-Typen an ihrem spezifischen Expressionsort ist bisher jedoch ungeklärt.



**Abb. 3: Struktur und Interaktion der desmosomalen Cadherine.** A) Genomische und molekulare Organisation der humanen desmosomalen Cadherine. Die Gene für die Desmogleine (DSG1-4) und Desmocolline (DSC1-3) sind alle auf dem langen Arm des Chromosoms 18 lokalisiert. Die Transkription der Cadherin-Typen erfolgt in entgegengesetzte Richtung. Die transmembranen Glykoproteine bestehen aus vier konservierten extrazellulären Domänen (EC1-4), einer variablen extrazellulären Ankerdomäne (EA), einer transmembranen Domäne (TM), sowie einer intrazellulären Ankerdomäne (IA) und weiteren Subtyp-spezifischen intrazellulären Domänen. Der zytoplasmatische Abschnitt von DSG weist zusätzlich eine Cadherin-ähnlichen Sequenz (ICS), eine prolinreiche Verbindungsdomäne (IPL), mehrere Wiederholungsdomänen (RUD) und eine Desmoglein-Terminaldomäne auf. Von den Desmocollin-Isoformen a und b, besitzt nur die a-Form die intrazelluläre Cadherin-ähnliche Sequenz, weshalb Isoform b nicht mit Plakoglobin interagieren kann. B) Schematische Darstellung der Cadherin-vermittelten desmosomalen Adhäsivität. Die desmosomalen Cadherine bilden über ihre extrazellulären Domänen heterophile (DSG/DSC) trans-Dimere und homo- (DSC/DSC) bzw. heterophile cis-Dimere aus. Die trans-Dimere vermitteln den adhäsiven Kontakt zwischen benachbarten Zellen. In diesem Zustand sind Desmosomen Ca<sup>2+</sup>-abhängig. In hyperadhäsiven Desmosomen entstehen zusätzlich laterale Bindungen (cis) zwischen benachbarten Cadherinen, wodurch Desmosomen ihre Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit verlieren (Modifiziert nach Getsios, 2004; Garrod, 2008).

### 2.2.3 Die adhäsive Funktion der desmosomalen Cadherine

Desmosomen unterscheiden sich von anderen Adhäsionsverbindungen durch ihren extrem festen Zusammenhalt und der damit verbundenen hohen mechanischen Belastbarkeit. Gleichzeitig sind sie dynamische Komplexe, deren Konformation zwischen einem niedrig und einem hoch (hyper)-adhäsiven Zustand wechseln kann (Garrod & Chidgey 2008). Die desmosomalen Cadherine nehmen dabei eine



Schlüsselrolle ein, indem sie über ihre extrazellulären Domänen lateral und transzellulär miteinander interagieren (Abb. 3B). Es wird vermutet, dass in weniger adhäsiven Desmosomen die Desmocolline und Desmogleine lediglich über trans-Dimere miteinander verbunden sind. In hyperadhäsiven Desmosomen sollen sich zusätzlich cis-Dimere zwischen benachbarten Cadherin-Molekülen derselben Zelle ausbilden, wobei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen fest eingebunden werden. Demnach sind Desmosomen in der frühen Embryonalentwicklung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig. In späteren Stadien entstehen jedoch zunehmend stabile Zell-Zell-Kontakte, die ihre  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit verlieren (Garrod & Kimura, 2008).

Die genaue Interaktion der extrazellulären Domänen der desmosomalen Cadherine und ihre bevorzugten Bindepartner *in vivo* sind bislang nicht besonders gut verstanden. Bisher war allgemein anerkannt, dass die desmosomale interzelluläre Adhäsivität durch heterophile trans-Interaktionen zwischen beiden Cadherin-Typen vermittelt wird. Homophile Bindungen wie bei den Adhärenzverbindungen wurden dagegen seltener nachgewiesen und zeigten eine deutlich schwächere Assoziation (Syed, 2002; Chitaev, 1997; Marcozzi, 1998). Neueste Erkenntnisse aus Zellkulturstudien hingegen belegen das Auftreten von homophilen, isoformspezifischen Cadherin-Cadherin-Bindungen innerhalb eines Desmosoms (Nie, 2011). Inwieweit diese Interaktionen von Bedeutung für die strukturelle und funktionelle Organisation der Desmosomen sind, lässt sich anhand dieser *in vitro* Daten nicht genau definieren. Entsprechende *in vivo* Daten liegen bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht vor.

Die essentielle Funktion der desmosomalen Cadherine für die Etablierung und Aufrechterhaltung der Desmosom-vermittelten Zelladhäsion und Gewebeintegrität wird zum einen durch humane Erkrankungen des Herzens und der Haut (siehe 2.2.5), aber auch durch Untersuchungen in transgenen Knockout-Mäusen verdeutlicht (Tab. 1). Deletionen der Cadherin-Gene resultieren entweder in einer sehr frühen embryonalen Letalität (Dsg2 und Dsc3, siehe 2.2.7) oder ähneln den hautpathologischen Phänotypen des Menschen. Dsg3-defiziente Tiere zeigen Hautläsionen, Haarverlust sowie Konjunktividen im Zusammenhang mit dem Auftreten von Halb-Desmosomen in oberen Zellschichten (Koch, 1997). Daneben führt der Verlust von Dsc1 zu zellulärer Hyperproliferation, einhergehend mit chronischer Dermatitis und Parakeratose (Chidgey, 2001).

#### **2.2.4 Die Glanzstreifen des Herzens**

Anders als in der Haut, stellen die Desmosomen im Herz der Vertebraten keine separierten Strukturen dar, sondern treten zusammen mit den Adhärenzverbindungen und den Gap junctions an den Glanzstreifen (Intercalated discs, ID) der Kardiomyozyten auf. Dabei handelt es sich um besonders feste Verzahnungen zwischen den Zellen, die durch einen etwa 20 nm breiten Spalt voneinander getrennt sind. Innerhalb der Intercalated discs bilden die adhäsiven Zellverbindungen ein einheitliches, junktionales System, das als Area composita bezeichnet wird (Franke, 2006; Borrmann, 2006). Demnach formen die molekularen Bestandteile der Desmosomen (DSC, DSG, PKP, PG, DSP) und der Adhärenzverbindungen (N-Cadherin,  $\beta$ -Catenin, p120-Catenin und  $\alpha$ -Catenin) eine fortlaufende Hybridstruktur, welche teilweise durch Gap junctions unterbrochen wird. Pieperhoff und Franke zeigten, dass die Entstehung der Area composita ein früher postnataler Prozess ist, deren endgültige dreidimensionale Struktur erst im adulten Stadium vollständig ausgebildet wird (Pieperhoff, 2007).

#### **2.2.5 Desmosomen in differenzierten Geweben – desmosomale Erkrankungen**

Aufgrund ihrer primär stabilisierenden Funktion, sind Desmosomen essentiell für die Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität differenzierter, mechanisch stark beanspruchter Gewebe. Dies zeigt sich in desmosomalen Erkrankungen, die überwiegend die Haut und das Herz betreffen (Tab. 1.). Die bekanntesten Beispiele sind Pemphigus vulgaris, Pemphigus foliaceus, Palmoplantar Keratoderma und die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC). In den Hauterkrankungen Pemphigus und Palmoplantar keratoderma sind ausschließlich die desmosomalen Cadherine des Desmoglein-Typs involviert. Während Palmoplantar Keratoderma durch Mutationen im DSG1-Gen hervorgerufen wird, richten sich in den Autoimmunerkrankungen Pemphigus vulgaris und foliaceus Autoantikörper gegen die extrazellulären Domänen von DSG1 bzw. 3. Bei der ARVC hingegen, konnten alle desmosomalen Grundkomponenten als Krankheitsgene identifiziert werden. Mutationen wurden dabei in den Genen für DSP, PKP2, PG, DSG2 und DSC2 beschrieben.

### **2.2.5.1 Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC)**

Die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) ist eine genetisch bedingte, überwiegend den rechten Ventrikel betreffende Herzmuskelerkrankung. Das pathologische Kennzeichen der ARVC ist ein progressiver Ersatz des Myokardiums durch Binde- bzw. Fettgewebe. Die geschätzte Prävalenz der ARVC liegt bei ca. 1:5000, mit einer höheren Inzidenz in männlichen als in weiblichen Individuen (3:1) (Smith, 2011). Klinisch manifestiert sich die ARVC vornehmlich zwischen dem 15. und 40. Lebensjahr durch das Auftreten von Herzrhythmusstörungen, wie Extrasystolen oder ventrikulären Tachykardien, die unter Umständen zum plötzlichen Herztod führen können (Wichter, 2005). Die Arrhythmien stehen vor allem in der frühen Krankheitsphase im Vordergrund. In späteren Stadien treten zunehmend morphologische Veränderungen in den Ventrikeln auf, wobei sich aus den primären Manifestationen häufig eine Rechtsherzinsuffizienz entwickelt. Insbesondere unter Sportlern ist die ARVC eine häufige Ursache für plötzliche Herztodesfälle, weshalb ein Zusammenhang zwischen körperlicher Belastung und dem klinischen Erscheinungsbild der ARVC vermutet wird (Corrado, 1990).

#### **2.2.5.1.1 Pathologie und Diagnostik**

Das makroskopische Kennzeichen der ARVC ist eine Dilatation des rechten bzw. linken Ventrikels mit einer Atrophie der Kardiomyozyten und nachfolgendem Ersatz durch Fett- und Bindegewebe. Die pathologische Degeneration des gesunden Myokards manifestiert sich vorzugsweise im Ausflusstrakt, dem Apex und der subtrikuspidalen Region der freien rechtsventrikulären Wand, dem sogenannten „Dysplasiedreieck“. Durch die progressiven fibro-adipösen Infiltrationen (≈ 50%) entstehen elektrisch isolierte Areale, die zu einer lokalen Verzögerung in der Erregungsweiterleitung und folglich zur Entstehung von Arrhythmien führen (Wichter, 2005; Basso, 2009).

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist die ARVC nur symptomatisch behandelbar. Die Identifizierung von zugrunde liegenden Genmutationen ermöglicht inzwischen eine frühzeitige Diagnostik, sowie präventive und therapeutische Interventionen zur Vermeidung des plötzlichen Herztodes. Dabei stehen Antiarrhythmika (β-Blocker, Sotalol, Amiodarone) oder die chirurgische Implantation eines Defibrillators zur Behandlung der malignen Rhythmusstörungen im Vordergrund. Bei einer globalen

Herzinsuffizienz im fortgeschrittenen Krankheitsstadium stellt in seltenen Fällen die Herztransplantation die einzige Behandlungsoption dar (Smith, 2011; Wichter, 2005).

#### **2.2.5.1.2 Genetik**

Die ARVC ist in den meisten Fällen eine familiäre Erkrankung (Corrado, 2009). Am häufigsten liegt ein autosomal-dominanter Vererbungsmodus mit inkompletter Penetranz und variabler Expressivität vor. Es wurden aber auch rezessive Formen identifiziert, in denen die ARVC im Komplex mit palmoplantaren Hyperkeratosen und wollenem Haar auftritt. Molekulargenetische Untersuchungen betroffener Familien zeigen eine genetische Heterogenität der ARVC mit bisher zwölf identifizierten chromosomalen Loci. Dominante Mutationen konnten vor allem in den für desmosomale Proteine kodierenden Genen DSP, JUP, PKP2, DSG2 und DSC2, aber auch in nicht-desmosomalen Genen wie RYR2 (ryanodine receptor 2), TMEM 43 (transmembrane protein 43) und TGFβ-3 (transforming growth factor beta 3) gefunden werden (Rampazzo, 2002; Asimaki, 2007; Gerull, 2004; Pilichou, 2006; Heuser, 2006; Tiso, 2001; Merner, 2008; Beffagna, 2005). Die überwiegende Anzahl der autosomal dominanten ARVC-Fälle sind dabei mit Mutationen in PKP2 (~25%) assoziiert. DSP, DSG2 und DSC2 hingegen machen nur 5-15% der Erkrankung aus (Fressart, 2010). JUP, DSP und DSC2 wurden ebenfalls als Krankheitsgene für die rezessiv auftretenden Formen der ARVC beschrieben (Norgett, 2000; McKoy, 2000; Simpson, 2009). Die homozygoten Mutationen in DSP und JUP sind auf den Chromosomen 6 und 17 lokalisiert und sind ursächlich für das Carvajal-Syndrom (DSP) und die Naxos-Erkrankung (JUP).

Die desmosomalen Cadherine wurden erst kürzlich (2006) als ARVC-assozierte Gene nachgewiesen, wobei Desmocollin 2 als fünftes desmosomales Protein identifiziert werden konnte (Pilichou, 2006; Heuser, 2006). Die erste beschriebene DSC2-Mutation liegt in Intron 5 (631-2A-G) und resultiert in einer kryptischen Spleißakzeptorstelle und in der Bildung eines verfrühten Stopp-Codons. Quantitative Analysen ergaben dabei eine deutlich verringerte kardiale DSC2-Expression, bei gleichzeitigem Fehlen des mutierten Transkriptes. Zusätzlich belegten Morpholino-Knockdown Experimente in Zebrafischembryonen die essentielle Bedeutung von Dsc2 für die Morphogenese und die Funktion des Herzens (Heuser, 2006). Weitere Mutationen betreffen neben der extrazellulären Domäne des Proteins auch die

intrazelluläre Region von DSC2a. Bei dem überwiegenden Anteil der Mutationen in Genabschnitten die für extrazelluläre Bereiche kodieren, handelt es sich um nonsense-Varianten, bei denen das Proteinprodukt nicht mehr in der Membran verankert werden kann. Die in zytoplasmatischen Bereichen liegenden Mutationen hingegen resultieren in missense-Verschiebungen und dem Einbau eines verkürzten Proteins, dem die Bindestelle für Plakoglobin fehlt (Gehmlich, 2011). Diese Mutationen führen jeweils zu einer ARVC mit überwiegender Beteiligung des linken Ventrikels, wobei die Patienten typische klinische und histologische ARVC-Merkmale aufweisen. Darüber hinaus existieren DSC2-Formen die eine geringere Pathogenität zeigen. Hierbei wird der maligne Phänotyp nur in Verbindung mit einer weiteren Mutation im zweiten DSC2-Allel (compound-heterozygot) oder in einem anderen desmosomalen Gen (doppelt-heterozygot) hervorgerufen (Delmar, 2010).

#### **2.2.5.1.3 Molekulare Pathogenese**

Der genaue Pathomechanismus der ARVC ist bis heute weitgehend ungeklärt. Da die zugrunde liegenden Mutationen hauptsächlich in den für desmosomale Proteine kodierenden Genen identifiziert wurden, wird die ARVC auch als eine Erkrankung der Desmosomen bezeichnet. Aufgrund der mutmaßlich primär stabilisierenden Funktion der desmosomalen Haftkomplexe wird angenommen, dass eine gestörte Integrität des Myokards pathophysiologisch ausschlaggebend ist. Danach führt die verminderte Adhäsivität unter den Bedingungen des mechanischen Stresses zu einem Verlust der Kardiomyozyten. Die progressive Infiltration von Fett- und Bindegewebe hat schließlich eine lokal gestörte Erregungsleitung zur Folge (Awad, 2008). Des Weiteren wird dem Zelltod durch Apoptose eine überwiegende Rolle zugeschrieben. TUNEL-Analysen von ARVC-Herzbiopsien zeigten eine erhöhte DNA-Fragmentation, ein Charakteristikum des programmierten Zelltodes (Nagata, 2000). Zudem konnte in Patientenproben eine gesteigerte Expression der apoptotischen Gene Caspase 3 und Bax nachgewiesen werden (Mallat, 1996). Inwieweit die Apoptose zur Pathogenese der ARVC beiträgt, ist bisher jedoch ungeklärt. Neuere Theorien hingegen weisen Plakoglobin eine bedeutende Funktion bei der Entstehung der ARVC zu. Insbesondere für die DSC2-assoziierten ARVC-Erkrankungen wird als zentraler Prozess die Dissoziation von Plakoglobin von den Intercalated discs postuliert (Gehmlich, 2011). Diese Studien stützen sich weitestgehend auf eine von

Garcia-Gras und Lombardi aufgestellte Hypothese, welche auf einer veränderten Signalfunktion des Armadilloproteins basiert (Garcia-Gras, 2006; Lombardi, 2009). Demnach wird die erhöhte Adipogenese durch eine partielle, nukleäre Translokation von Plakoglobin und der Inhibierung des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges in den Stammzellen des sekundären Herzfeldes hervorgerufen. Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ist ein wichtiger Schlüsselregulator zwischen Myogenese und Adipogenese. Dessen Inhibierung durch nukleares PG erhöht die Expression von adipogenetischen Genen, inhibiert hingegen die Expression von „connective tissue growth factor“ (CTGF), einem negativen Regulator der Adipogenese. Folglich vermittelt nukleares PG einen transkriptionalen Switch von Myogenese zu Adipogenese.

Des Weiteren führte die zunehmende Diagnose von Arrhythmien vor dem Auftreten fibro-adipöser Einlagerungen in den Herzen von ARVC-Patienten zu der Annahme, dass es im initialen Krankheitsstadium zu direkten Beeinträchtigungen der elektrischen Verbindungen kommt (Kaplan, 2004; Bauce, 2005). Dieses korrelierte mit dem Nachweis einer verminderten Expression bzw. einem veränderten Phosphorylierungsstatus von Cx43 in ARVC-Patienten mit Mutationen in PKP2 bzw. DSC2 oder DSG2 (Fidler, 2008; Gehmlich & Lambiase, 2011; Gehmlich, 2012). Inzwischen konnte in Zellkulturexperimenten eine Assoziation von Pkp2 mit Cx43 und dem Natrium-Kanal Nav1.5 belegt werden. Aber auch für Dsc2 und Dsg2 wurde eine direkte Interaktion mit Cx43 bzw. mit Nav1.5 nachgewiesen (Gehmlich, 2011; Rizzo, 2012; Sato, 2009; Sato, 2011). Dabei bleibt jedoch unklar, ob die aufgezeigten Veränderungen der Ionenkanalproteine primäre, pathogene Mechanismen sind, oder eher sekundäre Effekte darstellen, die im Zuge der Kardiomyopathie entstehen.

### **2.2.6 Rolle von desmosomalen Cadherinen in Signaltransduktionswegen**

Die desmosomalen Cadherine üben nicht nur eine rein mechanische Funktion bei der adhäsiven Verbindung zweier Zellen aus, sondern spielen auch eine zentrale Rolle in Signaltransduktionswegen. Untersuchungen in Knockout-Tieren demonstrierten zunächst die extra-desmosomale Bedeutung von Dsg2 und Dsc3. Die frühe embryonale Letalität der Dsg2 und Dsc3-defizienten Mäuse vor dem Auftreten reifer Desmosomen um E4.5 bzw. E2.5, lässt eine grundlegende Beteiligung in der frühen Morphogenese vermuten (Eshkind, 2002; Den, 2006). Mehrere Arbeiten belegen

inzwischen, dass die desmosomalen Cadherine wichtige regulatorische Aufgaben in Proliferations- und Differenzierungsprozessen erfüllen. Für Desmoglein 2 konnte beispielsweise eine Funktion in mehreren Wachstums- und Überlebenssignalwegen nachgewiesen werden. Dies zeigte sich in einem Mausmodell mit einer Überexpression von Dsg2 in der suprabasalen Schicht der Epidermis. Die transgenen Keratinozyten wiesen einen hyperproliferativen und Apoptose-resistenten Phänotyp, hervorgerufen durch eine verstärkte Aktivierung der PI3/AKT-, MAPK-, STAT3- und NFκB-Kaskaden auf (Brennan, 2007). Die Rolle von Dsg2 bei der Apoptoseregulation wurde ebenfalls von Nava *et al.* in einer *in vitro* Studie in epithelialen Zellen beschrieben. In dieser führt die Spaltung von Dsg2 durch Caspase 3 jedoch nicht zu einer Inhibierung, sondern zu einer Aktivierung des programmierten Zelltodes (Nava, 2007). Auch Dsc2 ist ein wichtiger Regulator der Zellproliferation. Zellkulturanalysen ergaben eine Beteiligung von Dsc2 am AKT/β-Catenin-Signalweg. Die Aktivierung dieser Signalkaskade durch den Knockdown von Dsc2 resultierte in einem verstärkten Proliferationsvermögen und einem erhöhten karzinogenen Potential der Zellen (Kolegraff, 2011). Eine weitere Verbindung konnte zwischen dem *Pemphigus vulgaris* (PV) Antigen Desmoglein 3 und dem p38-MAP-Kinase-Weg hergestellt werden. In Zellkulturstudien bewirkten Autoantikörper gegen Dsg3 die Aktivierung der p38-HSP27-Signalkaskade. Die Phosphorylierung von HSP27 hatte schließlich eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts zur Folge. Die Aufhebung dieser Effekte durch die Koinjektion des Dsg3-Antikörpers zusammen mit einem p38-MAPK-Inhibitor *in vivo*, bestätigte diese desmosomale Signalfunktion. (Berkowitz, 2005; Berkowitz, 2006).

### 2.2.7 Desmosomale Proteine in der Embryonalentwicklung

Während des 3,5 Tage langen Zeitraumes von der Befruchtung bis zur Blastozystenbildung laufen im Mausembryo eine Reihe von zusammenhängenden, komplexen Entwicklungsprogrammen ab. Dazu zählt unter anderem die Reifung der adhäsiven Zellkontakte, welche zur Ausbildung unterschiedlicher Gewebe beiträgt. Adhäsionsverbindungen entwickeln sich bereits im 8-Zellstadium des murinen Embryos, wobei Tight junctions und Adhärenzverbindungen vor den Desmosomen entstehen (Fleming, 1994). Typische Desmosomen, bestehend aus einer Mittellinie und den elektronendichten Plaques, sind erstmals im Trophektoderm ab dem 32-

Zellstadium erkennbar (Fleming, 1991). Zu diesem Zeitpunkt sind sie zunächst nur mit Zytokeratinfilamenten verbunden und üben wahrscheinlich eine stabilisierende Funktion gegenüber der zunehmenden mechanischen Belastung während der Blastozoelebildung aus (Jackson, 1980; Jackson, 1981). Die Synthese der desmosomalen Proteine ist zeitlich reguliert, beginnend mit Plakoglobin im 8-Zellstadium, Desmoplakin im 16-Zellstadium und zuletzt die desmosomalen Cadherine im 32-Zellstadium. Die späte Expression der Desmocolline und Desmogleine dient dabei vermutlich der schnellen Anordnung und Membranbindung der zuvor synthetisierten zytoplasmatischen Komponenten (Fleming, 1991). Knockout-Studien desmosomaler Gene in transgenen Mausmodellen zeigen wie essentiell die Desmosomen in der frühen Embryonalentwicklung sind (Tab. 1). Plakoglobin und Plakophilin 2-defiziente Tiere versterben infolge von Herzdefekten um Embryonaltag E10.5 (Bierkamp, 1996; Grossmann, 2004). Die Inaktivierung des Desmoplakin-Gens hingegen, führt bereits im Blastozystenstadium (E6.5) zur embryonalen Letalität (Gallicano, 1998). Ursächlich sind u.a. eine reduzierte Proliferation im embryonalen und extraembryonalen Gewebe, sowie ein beschädigtes Keratinfilamentnetzwerk im Zusammenhang mit einer reduzierten Anzahl und Größe der Desmosomen. Der stärkste Phänotyp wird jedoch durch den Verlust der desmosomalen Cadherine Dsg2 und Dsc3 induziert. Beide Knockout-Linien sind zu einer frühembryonalen Entwicklungsphase, bereits vor der Implantation um E2.5 (Dsc3) und E4.5 (Dsg2) letal. Durch das Fehlen reifer Desmosomen zu diesem frühen Zeitpunkt der Embryogenese, wird von einer extra-desmosomalen Funktion der Glykoproteine ausgegangen (Den, 2006; Eshkind, 2002).



<b>Protein</b>	<b>Expression</b>	<b>Phänotyp der Knockout-Maus</b>	<b>Humane Erkrankung</b>
<b>DSC1</b>	-mehrschichtige Epithelien -Epidermis: Körner- und Stachelschicht	-Chronische Dermatitis hervorgerufen durch Akantolyse -Haarverlust -Parakeratose	unbekannt
<b>DSC2</b>	-ubiquitär in desmosomalen Geweben (Herz, Leber, Niere...) -Epidermis: Basalschicht	unbekannt	-ARVC
<b>DSC3</b>	-mehrschichtige Epithelien -Epidermis: Basalschicht	-embryonal letal (E2.5)	unbekannt
<b>DSG1</b>	-Epidermis: Stachel- und Körnerschicht	unbekannt	-Keratoderma -Pemphigus foliaceus
<b>DSG2</b>	-ubiquitär in desmosomalen Geweben -Epidermis: Basalschicht	-embryonal letal (E4.5)	-ARVC
<b>DSG3</b>	-Epidermis: Basalschicht -Schleimhäute	-eitrige Konjunktivitis -Haarverlust -verkrustete Hautläsionen	-Pemphigus vulgaris
<b>DSG4</b>	-Epidermis: Körner- und Stachelschicht	unbekannt	unbekannt
<b>DSP</b>	-ubiquitär in desmosomalen Geweben -Epidermis: alle Schichten	-embryonal letal (E6.5)	-ARVC
<b>PKP2</b>	-ubiquitär in desmosomalen Geweben -Epidermis: alle Schichten	-embryonal letal (E10.5)	-ARVC
<b>PG</b>	-ubiquitär in desmosomalen Geweben -Epidermis: alle Schichten	-embryonal letal (E10.5)	-ARVC

Tab. 1: Desmosomale Proteine in der Embryonalentwicklung und in humanen Erkrankungen.

### 3. Zielstellung

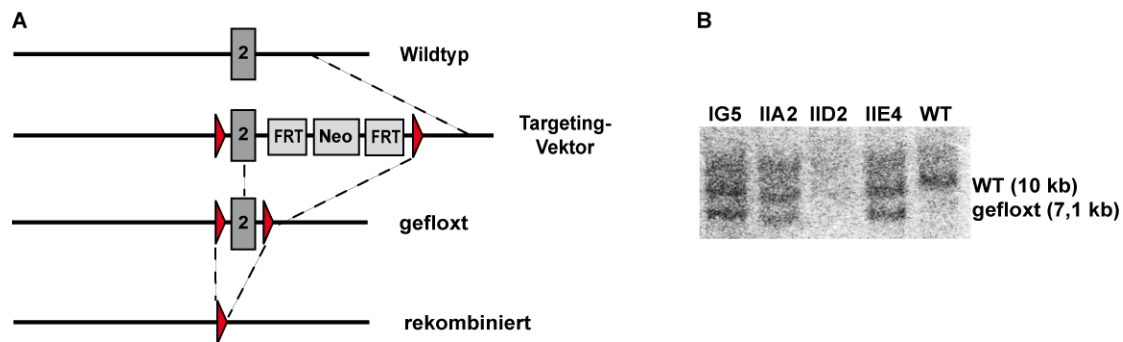
Desmosomen sind als adhäsive Zellverbindungen vor allem in mechanisch stark beanspruchten Geweben wie der Haut oder dem Herz für die Aufrechterhaltung der strukturellen Stabilität und zellulären Integrität von essentieller Bedeutung. Die hohe Adhäsivität wird dabei im Wesentlichen durch die transmembranen Cadherine des Desmocollin- und Desmoglein-Typs bestimmt, deren extrazelluläre Domänen den Kontakt zwischen zwei benachbarten Zellen herstellen. Desmocollin 2 und Desmoglein 2 sind aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens in allen Desmosomenreichen Geweben die Hauptisoformen der desmosomalen Cadherine. Im Gegensatz zu Dsg2 gibt es bisher keine fundierten Kenntnisse zur Funktion von Dsc2 *in vivo*. Dessen frühe Expression im 32-Zellstadium lässt vermuten, dass Dsc2 bereits während der frühembryonalen Entwicklung von wesentlicher Bedeutung ist. Des Weiteren demonstrieren die ARVC-Mutationen im DSC2-Gen und die gestörte Bildung der myokardialen Struktur infolge eines Morpholino-Knockdowns in Zebrafisch-Embryonen, dass Dsc2 insbesondere bei der Morphogenese und Funktion des Herzens eine essentielle Rolle zu spielen scheint. In diesem Zusammenhang war das Ziel der Arbeit die generelle und die herzspezifische Funktion von Desmocollin 2 während verschiedener Entwicklungsstadien zu untersuchen. Im Speziellen sollte der Einfluss von Dsc2 auf die pränatale Entwicklung des Embryos, auf die Bildung und Komposition kardialer Desmosomen, die Integrität der Intercalated discs sowie auf die Struktur, Funktion und mechanische Belastbarkeit des Herzens analysiert werden. Im Hinblick auf eine mögliche Signalfunktion von Desmocollin 2, war im Weiteren die molekulare Analyse potentiell veränderter Signaltransduktionswege von Interesse. Die Erkenntnisse dieser Studie sollen zu einem besseren Verständnis des funktionellen Aufbaus der Desmosomen und der Area Composita beitragen. Die erhobenen Ergebnisse könnten neue Einblicke in den Pathomechanismus der ARVC ermöglichen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Generierung einer Desmocollin 2-defizienten Mauslinie

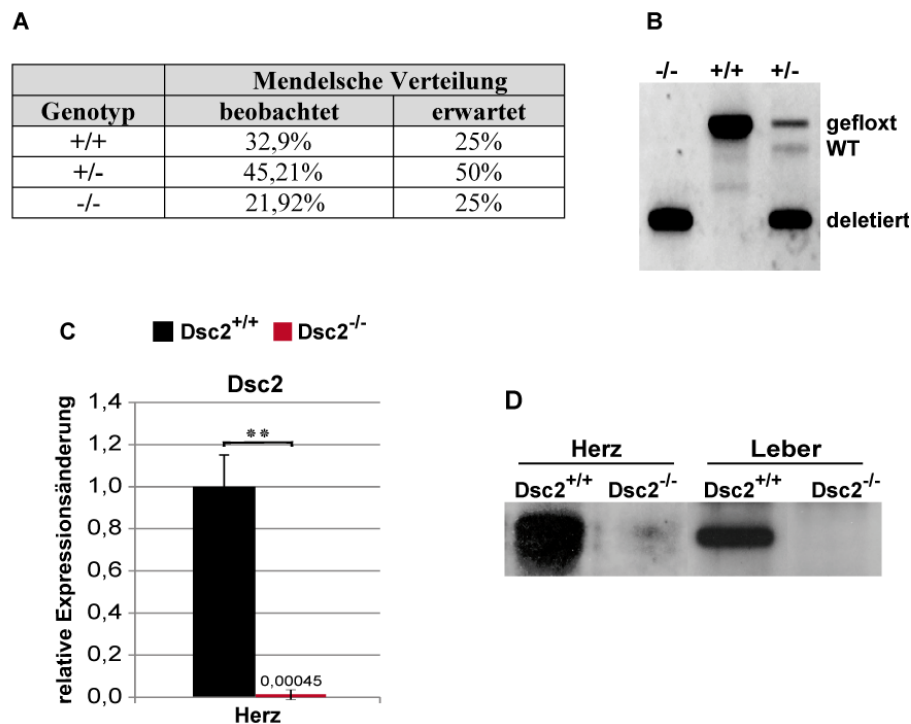
Um die Rolle von Desmocollin 2 sowohl während der Embryonalentwicklung als auch dessen spezifische Funktion im adulten Herzen zu untersuchen, wurde eine konditionale Mauslinie unter Verwendung des Cre/loxP-Rekombinationssystems generiert. Zur Erzeugung einer Null-Mutation im *Dsc2*-Gen wurde ein Targeting-Vektor mittels homologer Rekombination hergestellt (Abb. 4A). In diesem Targeting-Vektor ermöglichen die upstream und downstream von Exon 2 eingebrachten loxP-Sequenzen ein durch die Cre-Rekombinase vermitteltes Ausschneiden von Exon 2. Die dadurch induzierte Leserasterverschiebung in Exon 3 hat die Bildung eines verfrühten Stopp-Codons und somit die frühzeitige Translations-Termination von *Dsc2* zur Folge. Für die spätere Selektion von ES-Zellklonen wurde zusätzlich ein Neomycinresistenzgen, flankiert von FLP-Rekombinase-Erkennungsstellen (FRT), an das 3'-Ende von Exon 2 kloniert. Die Transfektion des Targeting-Vektors in embryonale Stammzellen erfolgte in Kooperation mit der Transgenic Core Facility des Max-Delbrück-Centrums. ES-Zellklone wurden mittels Southern Blot auf homologe Rekombination untersucht. Das mutierte *Dsc2*-Allel entsprach einem Fragment von 7,1 kb, während das WT-Allel eine Größe von 10 kb aufwies (Abb. 4B). Zwei homolog rekombinierte Zellklone wurden in Blastozysten injiziert und in den Uterus scheinschwangerer Mäuse implantiert. Die anschließende Verpaarung der daraus hervorgegangenen weiblichen Chimären mit C57BL/6-Männchen ergab in der F1-Generation heterozygote Nachkommen für das gefloxtete *Dsc2*-Allel. Deren Rückkreuzung mit dem C57BL/6-Stamm erfolgte bis zur F4-Generation, sodass die transgenen Tiere einen einheitlichen genetischen Hintergrund aufweisen. Um einen ubiquitären sowie einen herzspezifischen Knockout von *Dsc2* zu erzeugen, wurden homozygot gefloxtete Tiere der konditionalen Linie mit dem Cre-deleter oder dem MerCreMer-Mausstamm verpaart. In den Cre-deleter Tieren wird die Cre-Rekombinase in der Keimbahn exprimiert, wodurch das Zielgen bereits während der Embryonalentwicklung in allen Geweben inaktiviert wird. Die MerCreMer-Linie hingegen, ist Träger einer Cre-Rekombinase, die der Kontrolle des kardialen, Tamoxifen-induzierbaren alpha-myosin-heavy-chain ( $\alpha$ MHC) Promotors unterliegt. Da das Zielgen zu jedem beliebigen Zeitpunkt ausgeschaltet werden kann, bietet

diese Linie somit die Möglichkeit eine eventuelle embryonale Letalität des konstitutiven Knockouts zu umgehen.



**Abb. 4: Generierung von Dsc2-defizienten Mäusen.** A) Schematische Darstellung der Targeting-Strategie des Dsc2-Gens. In dem Targeting-Vektor wird das Exon 2 (dunkelgraue Box) von zwei loxP-Sequenzen (rote Pfeilspitzen) flankiert. Das durch die Cre-Rekombinase vermittelte Ausschneiden von Exon 2 führt zu einer Leserasterverschiebung und einem verfrühten Stopp-Codon in Exon 3. Die Neomycin-Kassette (Neo) wurde downstream von Exon 2 integriert. Die flankierenden FRT-Sequenzen vermitteln die spätere Exzision des Neo-Gens durch die FLP-Rekombinase. B) Southern Blot-Analyse von transfizierten ES-Zellklonen. Die 3' externe Sonde detektierte ein 10 kb großes Wildtyp (WT)-Fragment und ein 7,1 kb großes mutiertes Fragment des Dsc2-Gens. Die Klone IG5, IIA2 und IIE4 sind positiv für das gefloxt Dsc2-Allel.

Für die geplanten Untersuchungen zur Funktion von Dsc2 sollte zunächst die klassische Knockout-Mauslinie generiert und analysiert werden. Homozygot Dsc2-defiziente Tiere gingen aus der Verpaarung heterozygoter Dsc2-Cre-deleter Mäuse untereinander hervor. Entgegen der Erwartung waren die Dsc2<sup>-/-</sup>-Tiere lebensfähig und wurden entsprechend der Mendelschen-Regeln geboren. Von insgesamt 5 unabhängigen Würfen wurden sämtliche Jungtiere (n=73) im Alter von 3 Wochen auf ihren Genotyp analysiert. Mittels PCR konnten 32,9% Wildtyp-Tiere (+/+), 45,21% heterozygote Tiere (+/-) und 21,92% homozygote Tiere (-/-) identifiziert werden (Abb. 5A, B). Um die Effizienz des Dsc2-Knockouts zu verifizieren, wurden Western Blot und Real-time PCR-Analysen durchgeführt. In den homozygot mutierten Tieren war im Vergleich zu den Wildtypen sowohl im Herzen als auch in der Leber keine Proteinexpression von Dsc2 nachweisbar. Die effektive Inaktivierung des Dsc2-Gens wurde im Herzen zusätzlich auf RNA-Ebene bestätigt (Abb. 5C, D).



**Abb. 5: Analyse der F1-Generation heterozygoter Dsc2-Cre-deleter Verpaarungen.** A) Mendelsche Verteilung von 5 unabhängigen Würfen (n=73). Homozygot Dsc2-defiziente Tiere (-/-), heterozygote Tiere (+/-) und Wildtypen (+/+) wurden im, nach Mendelschen Regeln erwarteten, prozentualen Verhältnis geboren. B) Genotypisierungs-PCR über den Dsc2-Locus. C+D) Expressionsanalyse von Dsc2 in Herzgewebe und Leber 4 Wochen alter Mäuse. Die Effizienz des Knockouts wurde mittels QRT-PCR (C) und Western Blot (D) verifiziert. Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*\*  $p < 0,01$ .

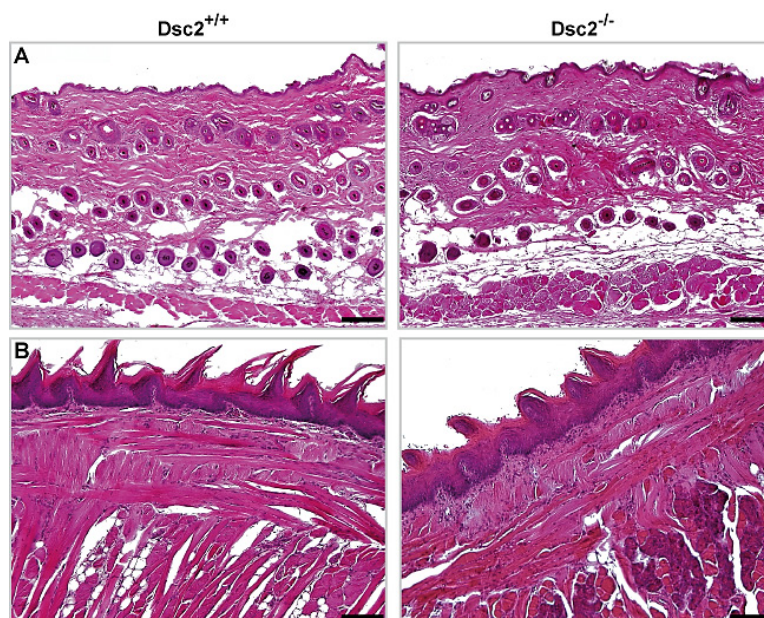
## 4.2 Analyse des pränatalen Phänotyps der Dsc2<sup>-/-</sup>-Tiere

Studien zur Expression der desmosomalen Cadherine demonstrierten deren frühe, zeitlich regulierte Transkription ab dem 32-Zellstadium im Zusammenhang mit der Formation erster Desmosomen im Trophektoderm der Blastozyste. Des Weiteren belegten Deletionen der Cadherin-Gene in transgenen Mausmodellen wie essentiell die Desmocolline und Desmogleine während der Embryogenese sind. Dies ließ vermuten, dass der Verlust von Desmocollin 2 pränatale Entwicklungsstörungen hervorruft. Die Untersuchung möglicher morphogenetischer bzw. kardialer Defekte erfolgte an Embryonaltag 13.5 (E13.5). Äußerlich zeigten die Dsc2<sup>-/-</sup>-Embryonen keine Auffälligkeiten. Größe und allgemeine Morphologie waren mit wildtypischen Kontrollen vergleichbar. Es lagen weder Blutungen noch Pigmentstörungen vor. Des Weiteren ergab die vergleichende Analyse der kardialen Struktur anhand von HE-gefärbten Transversalschnitten durch das embryonale Herz keine Anomalien in der

Beschaffenheit des kompakten Myokardiums, des Epikardiums oder der Trabekelschicht (Abb. 7A). Es konnten keine septalen oder vaskulären Fehlbildungen in den Herzen  $Dsc2^{-/-}$ -Embryonen nachgewiesen werden.

### 4.3 Analyse des postnatalen Phänotyps der $Dsc2^{-/-}$ -Tiere

Über einen Beobachtungszeitraum von einem Jahr zeigten die  $Dsc2$ -defizienten Tiere im Vergleich zu wildtypischen Wurfgeschwistern keine Unterschiede in Bezug auf Größe, Fertilität oder äußeres Erscheinungsbild. Haut, Fell, Schleimhäute und Tastaare neugeborener sowie adulter Knockout-Mäuse wiesen keine pathologischen Befunde auf. Insbesondere wurde auf Veränderungen wie Entzündungen, Blasenbildung, Hauterosionen, Verkrustungen oder Haarverlust geachtet. Aufgrund der ubiquitären Expression von  $Dsc2$  in allen Desmosomen-bildenden Geweben erfolgte im Weiteren eine histologische Charakterisierung von Herz, Epidermis, Zunge, Niere, Darm, Leber und Milz. Übersichtsfärbungen mit Hämatoxylin und Eosin wurden auf Zellgröße, Organisation der Zellschichten, strukturelle Merkmale und Entzündungsreaktionen untersucht. Die morphologische Analyse ergab bei keinem der  $Dsc2^{-/-}$ -Organe einen signifikanten Unterschied (Abb. 6).

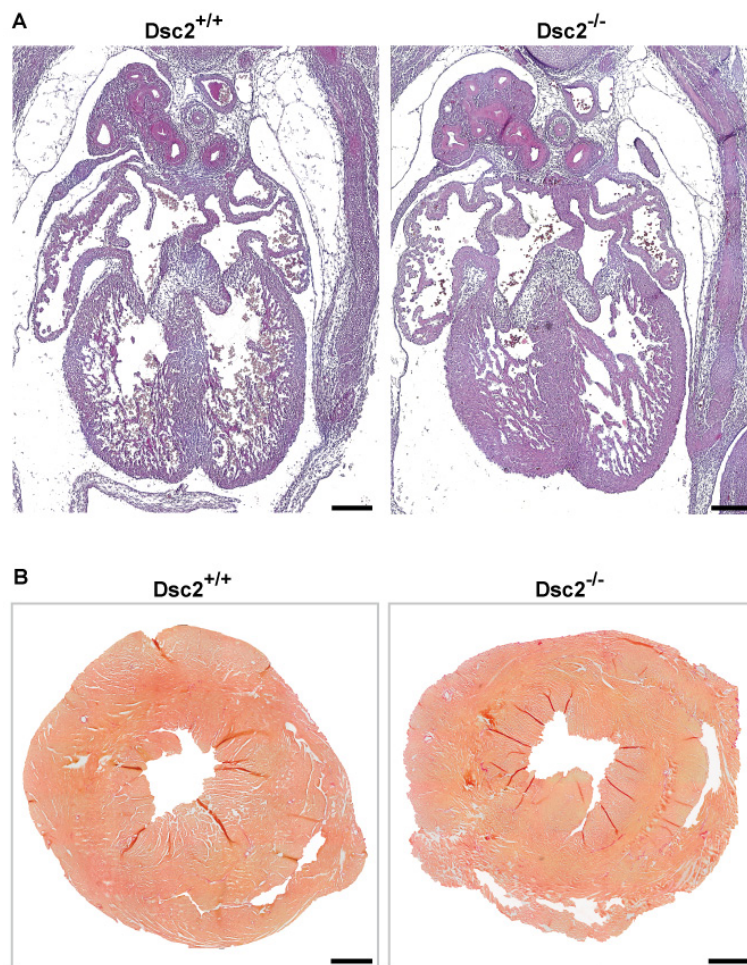


**Abb. 6: Histologische Charakterisierung Desmosom-bildender Organe in  $Dsc2^{-/-}$ -Mäusen.** Dargestellt sind HE-Färbungen von Haut (A) und Zunge (B) 10-15 Wochen alter Wildtyp- und Knockout-Tiere. Haut, Zunge sowie Niere, Darm, Leber und Milz wurden hinsichtlich morphologischer und immunologischer Merkmale analysiert. In keinem der untersuchten Organe der  $Dsc2^{-/-}$ -Tiere konnten pathologische Veränderungen festgestellt werden. Größenbalken: 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4.3.1 Unveränderte Herzfunktion und Herzmorphologie in Dsc2<sup>-/-</sup>-Tieren

Desmosomen kommen vor allem in mechanisch stark beanspruchten Geweben wie dem Myokardium vor. Da Desmocollin 2 die einzige kardial exprimierte Dsc-Isoform ist, könnte dessen Verlust insbesondere zu einer Beeinträchtigung des Herzens führen. In jungen adulten Tieren wurden zunächst *in vivo* Funktion und Morphologie des linken Ventrikels echokardiographisch bestimmt. Die Werte der funktionellen Parameter lagen im Normbereich, sodass keine kardiale Dysfunktion in den Dsc2 Nullmäusen vorlag. Die Verkürzungsfraction der Dsc2-defizienten Herzen betrug  $26,64 \pm 1,3\%$  ([n=11] vs. WT:  $26,9 \pm 1,2\%$  [n=9]) und die Ejektionsfraction  $52,7 \pm 2,4\%$  (vs. WT:  $54,9 \pm 1,2\%$ ). Auch morphologisch ließen sich bei den Dsc2<sup>-/-</sup>-Herzen keine Auffälligkeiten erkennen. Die Analyse der linksventrikulären Hinterwanddicke, der interventrikulären Septumdicke und des linksventrikulären Diameters ergab keine Unterschiede im Vergleich zu den Kontrolltieren. Um pathologische Veränderungen auf zellulärer Ebene ausschließen zu können, wurden die Herzen präpariert und histologische Übersichtsfärbungen angefertigt. In Korrelation zu den Echokardiographie-Ergebnissen, waren die Herzen adulter Dsc2<sup>-/-</sup>-Mäuse makroskopisch normal entwickelt und zeigten keine Anzeichen von Hypertrophie oder Einblutungen. HE-gefärbte transversale Herzschnitte homozygoter Mutanten wiesen hinsichtlich der Wanddicken sowie der rechts- und linksventrikulären Kammergrößen keine Abweichungen gegenüber den WT-Kontrollen auf. Im Myokardium der transgenen Tiere waren ebenfalls keine histopathologischen Auffälligkeiten wie Fibrose oder inflammatorische Infiltrate nachzuweisen (Abb. 7B).





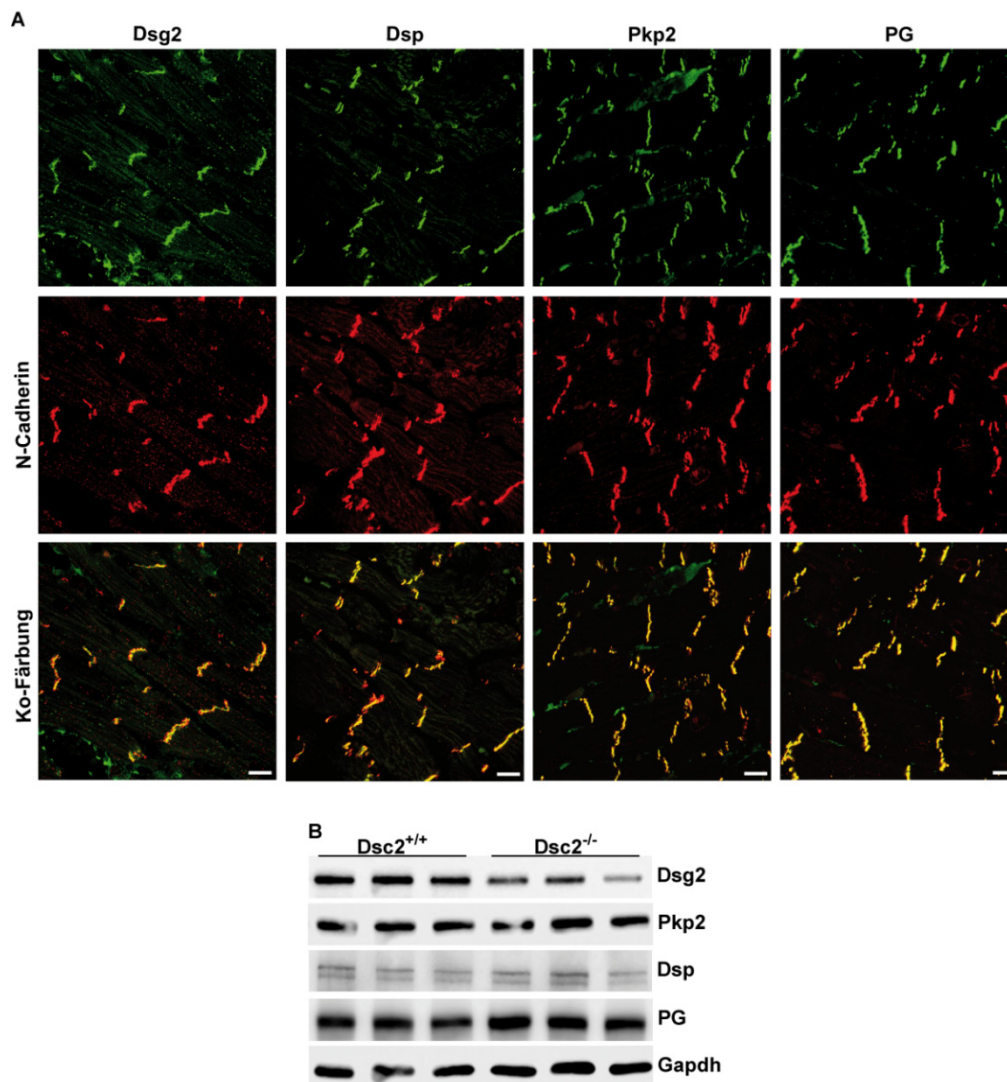
**Abb. 7: Histologie adulter und embryonaler *Dsc2*<sup>-/-</sup>-Herzen.** A) HE-gefärbte Paraffinschnitte durch das Herz E13.5 Embryonen. Es lagen keine kardialen Entwicklungsdefekte in *Dsc2*<sup>-/-</sup>-Embryonen vor.  $n_{WT}=7$ ;  $n_{KO}=9$ . B) Sirius Red-Färbung transversaler Herzschnitte 20 Wochen alter Tiere. Die adulten *Dsc2*<sup>-/-</sup>-Herzen waren morphologisch unverändert und wiesen keine histopathologischen Veränderungen wie Immuninfiltration oder Fibrose auf. Größenbalken: 800  $\mu$ m.

#### 4.3.2 Aufrechterhaltung der molekularen Komposition und ultrastrukturellen Organisation der Desmosomen *Dsc2*-defizienter Herzen

Desmocollin 2 ist als transmembrane Komponente ein Hauptbestandteil des Desmosoms. Aufgrund dessen ist davon auszugehen, dass es durch die Inaktivierung des *Dsc2*-Gens zu molekularen und strukturellen Veränderungen der Zellverbindungen kommt. Die molekulare Zusammensetzung der Desmosomen wurde mittels Immunfluoreszenzfärbungen analysiert. Von besonderem Interesse war dabei, inwieweit die desmosomalen Proteine an den Intercalated discs der Kardiomyozyten lokalisieren. Diesbezüglich wurden Ko-Färbungen mit N-Cadherin, einem Bestandteil der Adhärenzverbindungen, angefertigt. Widererwartend wiesen die Knockout-

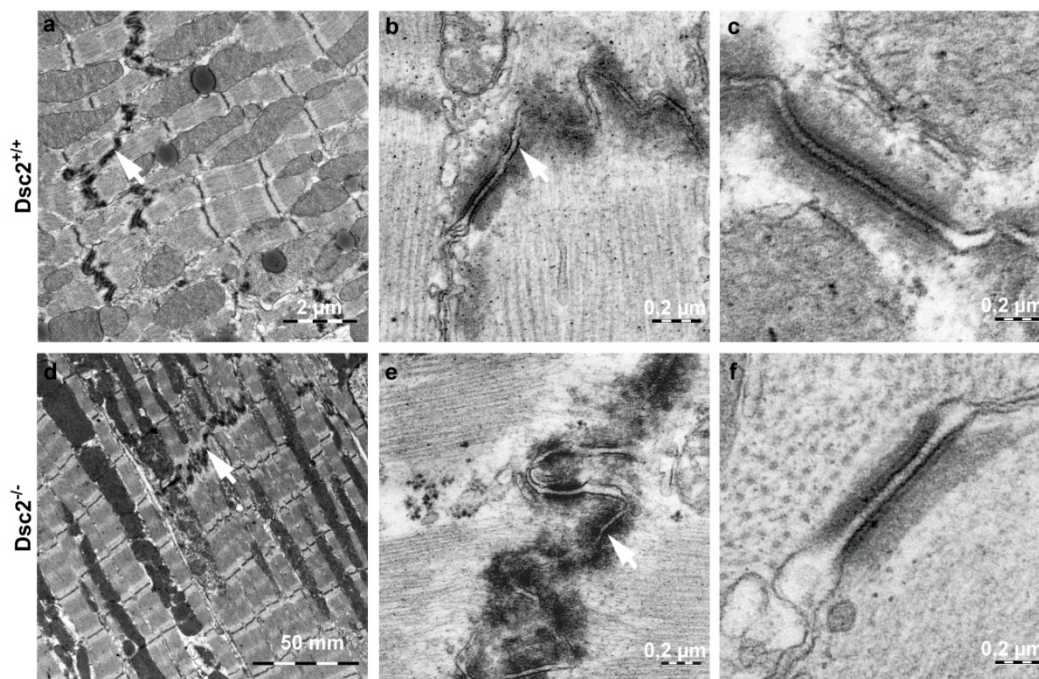


Herzen keine Veränderungen in der molekularen Komposition der Desmosomen auf. Wie in den WT-Herzen fand eine Kolokalisation von Dsp, Pkp2, Dsg2 sowie von PG mit N-Cadherin an den Glanzstreifen der Kardiomyozyten statt. Des Weiteren konnten keine Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten beobachtet werden, was auf eine unveränderte Expression der desmosomalen Proteine schließen lässt. Western Blot-Analysen bestätigten ein vergleichbares Expressionsniveau von Dsp, Pkp2, Dsg2 und PG in  $Dsc2^{-/-}$  und  $Dsc2^{+/+}$ -Herzen.



**Abb. 8: Molekulare Komposition  $Dsc2^{-/-}$ -Desmosomen.** A) Immunfluoreszenzfärbungen von Desmoglein 2 (Dsg2), Desmoplakin (Dsp), Plakophilin 2 (Pkp2), Plakoglobin (PG) (grün) und N-Cadherin (rot) auf Kryoschnitten kardialen Gewebes  $Dsc2$ -defizienter Tiere. Die überlagerten Fluoreszenzbilder sind in der unteren Spalte dargestellt. Alle desmosomalen Proteine kolokalisierten mit dem Adhärenzverbindungs-Protein N-Cadherin an den Intercalated discs. Größenbalken: 75  $\mu$ m. B) Western Blot-Analysen der desmosomalen Proteine. Der Verlust von  $Dsc2$  hat keinen Einfluss auf die Expression von Dsg2, Pkp2, Dsp und PG.  $Dsc2^{-/-}$  und  $Dsc2^{+/+}$ -Tiere zeigten ein vergleichbares Expressionsniveau.

Um die Zellverbindungen Dsc2-defizienter Kardiomyozyten im Hinblick auf ultrastrukturelle Veränderungen zu charakterisieren, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der *Area Composita* angefertigt. In den Dsc2<sup>-/-</sup>-Tieren zeigten die Glanzstreifen einen regulären Wechsel von Desmosomen und Adhärenzverbindungen. Sowohl die Desmosomen als auch die Adhärenzverbindungen waren morphologisch unverändert. Die Desmosomen erschienen als hochorganisierte, elektronendichte Strukturen und wiesen alle typischen ultrastrukturellen Merkmale auf. Sie bestanden aus einer dichten Mittellinie sowie aus jeweils einem äußeren und einem inneren zytoplasmatischen Plaque beiderseits der Zytoplasmamembran (Abb. 9c, f). Des Weiteren ergaben morphometrische Analysen keine Unterschiede in Anzahl der Desmosomen, Größe des intrazellulären Plaques oder Weite des interzellulären Spaltes. Innerhalb der Zelle stellen die Desmosomen und die Adhärenzverbindungen wichtige Ankerstrukturen für das Zytoskelett dar, weshalb dieses genauer betrachtet wurde. In Übereinstimmung zu der unveränderten Ultrastruktur der Zellverbindungen, konnte in den Herzen Dsc2-defizienter Tiere keine Beeinträchtigung in der Anbindung zytoskelettaler Strukturen festgestellt werden. Die Sarkomere und Intermediärfilamente waren in beiden Genotypen regelrecht ausgerichtet (Abb. 9a, b, d, e).

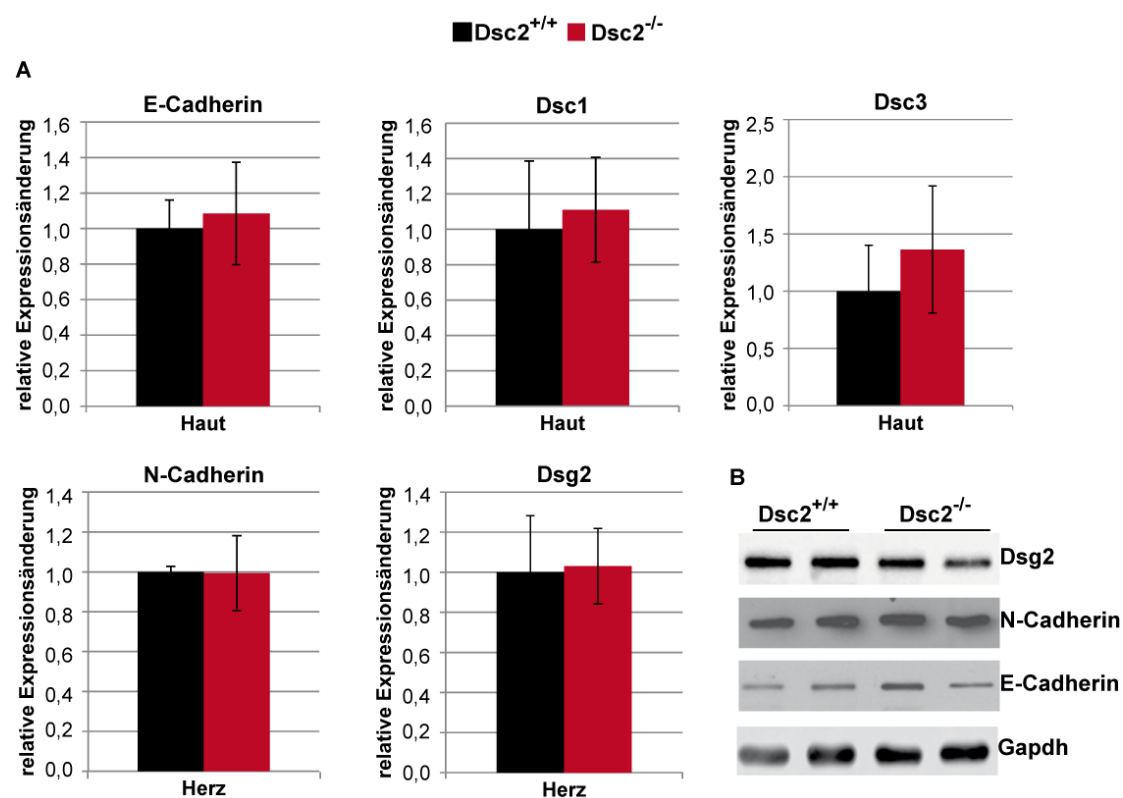


**Abb. 9: Ultrastrukturelle Charakterisierung der Intercalated discs.** Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen ultradünner Herzschnitte von Wildtyp- und Knockout-Tieren zeigten regelmäßig angeordnete Sarkomere (a, d). In den Intercalated discs (weiße Pfeile) lagen die Adhärenzverbindungen und die Desmosomen unverändert vor. Aktin- und Intermediärfilamente ragten gleichmäßig hinein (b, e). Die Desmosomen waren durch eine dichte Mittellinie und zwei elektronendichte, zytoplasmatische Plaques charakterisiert (c, f).

#### 4.3.3 Analyse möglicher Kompensationsmechanismen in Dsc2-defizienten Mäusen

Wird ein Gen bereits in der Keimbahn inaktiviert, besteht die Möglichkeit, dass der Verlust durch verwandte Strukturproteine kompensiert werden kann. Da die Dsc2-defizienten Tiere keinen pathologischen Phänotyp entwickelten, noch eine molekulare oder ultrastrukturelle Veränderung der Desmosomen festzustellen war, sollten im Folgenden potentielle Kompensationsmechanismen analysiert werden. Aufgrund der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten, ist ein Funktionsausgleich von Dsc2 durch desmosomale und klassische Cadherine denkbar. Die Ausbildung heterophiler trans-Dimere könnte durch Dsc1/3 bzw. durch N- oder E-Cadherin ermöglicht werden. Eine Kompensation durch Dsg2 hingegen, würde zu homophilen transzellulären Interaktionen führen. Auf mRNA und/oder Protein-Ebene wurde untersucht, ob der Knockout von Dsc2 in einer entsprechenden Überexpression der transmembranen Adhäsionsproteine resultiert. In wildtypischen Tieren werden Dsc1,

Dsc3 und E-Cadherin vornehmlich in den Schichten der Haut gebildet. Im Herzen sind Dsg2 und N-Cadherin die prädominanten Isoformen. Die transgenen Tiere wiesen keine Veränderungen im Expressionsprofil von den desmosomalen (Dsc1, Dsc3, Dsg2) und den klassischen Cadherinen (E- und N-Cadherin) auf. Des Weiteren lagen keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen  $Dsc2^{-/-}$  und  $Dsc2^{+/+}$ -Tieren vor. QRT-PCR und/oder Western Blot-Analysen zeigten eine im Vergleich zu den Wildtypen unveränderte Expression von Dsc1, Dsc3 und E-Cadherin in der Haut, bzw. von Dsg2 und N-Cadherin in den Herzen adulter  $Dsc2$ -defizienter Mäuse (Abb. 10).



**Abb. 10: Analyse potentieller Kompensationsmechanismen - Cadherin-Expression in  $Dsc2^{-/-}$ -Mäusen.** Real-time PCR (A) und Western Blot-Analysen (B) zeigten ein gewebespezifisches Expressionsmuster der desmosomalen und klassischen Cadherine. Es konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede von Dsc1, Dsc3 und E-Cadherin in der Haut und von Dsg2 und N-Cadherin in den Herzen 8 Wochen alter  $Dsc2^{-/-}$  (rote Säulen) und  $Dsc2^{+/+}$ -Tiere (schwarze Säulen) nachgewiesen werden. Mittelwerte  $\pm$  SEM.

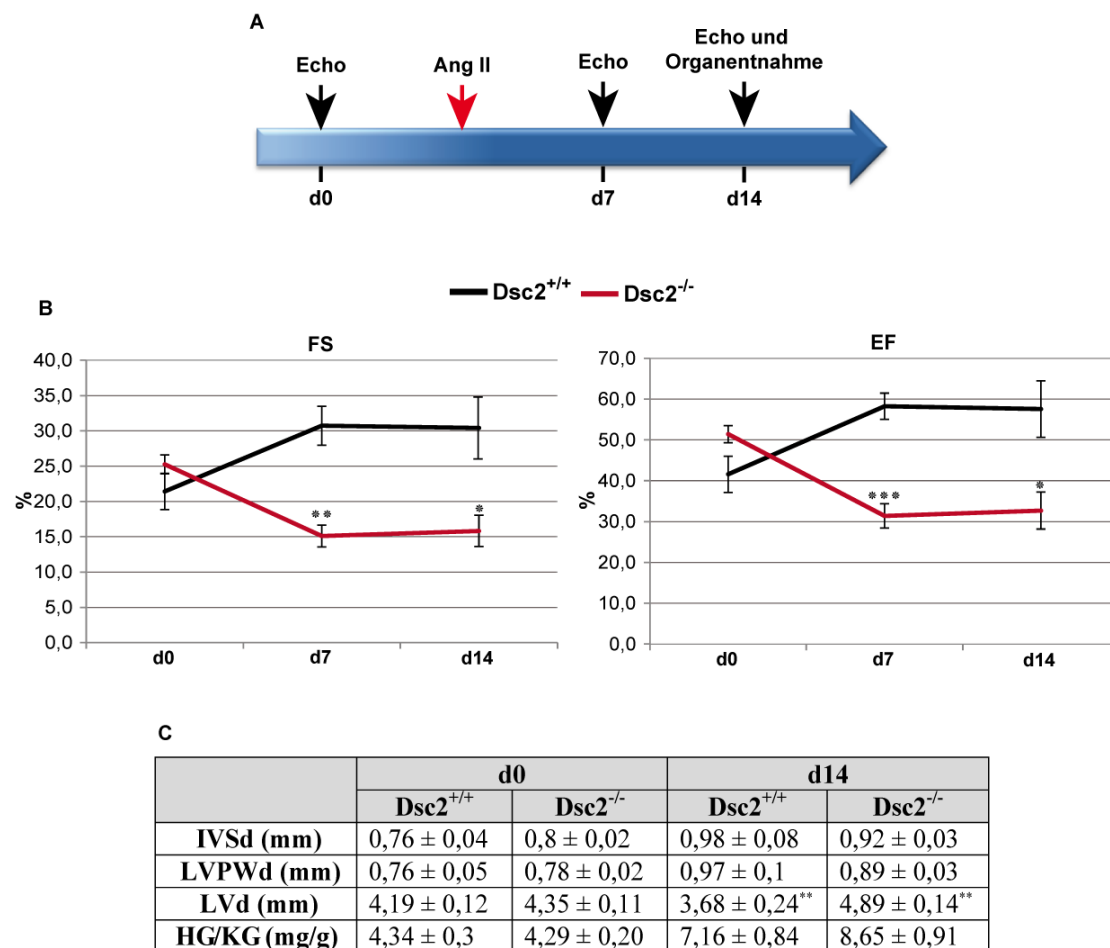
## 4.4 Analyse der Dsc2-defizienten Tiere unter Belastungsbedingungen

### 4.4.1 Angiotensin II (Ang II)–Belastungsmodell

#### 4.4.1.1 Pathologischer Herzphänotyp Dsc2<sup>-/-</sup>-Mäuse

Desmosomen wird eine primär stabilisierende Funktion zugeschrieben. Für die Etablierung der desmosomalen Adhäsivität sind vor allem die transmembranen Komponenten von essentieller Bedeutung. Da unter basalen Bedingungen keine strukturellen Veränderungen der Dsc2<sup>-/-</sup>-Desmosomen festzustellen waren, ließ dies vermuten, dass der Knockout von Dsc2 eine verminderte desmosomale Stabilität, und somit eine verminderte mechanische Beanspruchbarkeit des Herzens zur Folge hat. Um den strukturellen Zusammenhalt und die mechanische Widerstandsfähigkeit der Dsc2-defizienten Desmosomen und Kardiomyozyten zu untersuchen, wurden die Tiere im Alter von 15-20 Wochen erhöhten Belastungsbedingungen durch die Applikation von Ang II ausgesetzt. Die Ang II-Infusion bewirkt über die Aktivierung von Ang II-Rezeptoren einen Anstieg der Nachlast, was in einer erhöhten Pumpleistung des Herzens resultiert. Während des Versuchszeitraumes erfolgten nach 7 (d7) und 14 Tagen (d14) echokardiographische Untersuchungen der Herzfunktion und -morphologie (Abb. 11A). Die Ausprägung eines pathologischen Phänotyps wurde anhand der linksventrikulären Parameter Ejektionsfraktion (EF), Verkürzungsfraktion (FS), der Hinterwanddicke (LVPWd), der interventrikulären Septumdicke (IVSd) und des ventrikulären Diameters (LVd) während der Enddiastole überwacht. Infolge der erhöhten Nachlast war in den Wildtypen keine beeinträchtigte Herzfunktion festzustellen. Die FS- und EF-Werte lagen an d14 mit  $30,41 \pm 4,4\%$  (FS) bzw.  $57,56 \pm 6,9\%$  (EF) im Normalbereich. Dahingegen ergab die quantitative Analyse der linksventrikulären Leistung in den Dsc2<sup>-/-</sup>-Tieren eine signifikante Reduktion der FS und der EF. Die Verkürzungsfraktion nahm von  $25,25 \pm 1,4\%$  (d0) auf  $15,11 \pm 1,6\%$  (d7) bzw.  $15,83 \pm 2,2\%$  (d14) und die Ejektionsfraktion von  $51,43 \pm 2,1\%$  (d0) auf  $31,38 \pm 3,0\%$  (d7) bzw.  $32,71 \pm 4,5\%$  (d14) ab. Wie erwartet führte die Ang II-Applikation zur Entstehung einer leichten kardialen Hypertrophie. Die echokardiographisch ermittelten morphologischen Parameter zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Dsc2<sup>-/-</sup> und den Dsc2<sup>+/+</sup>-Mäusen. In beiden Versuchstiergruppen fand bis zum Zeitpunkt d14 eine gleichstarke Veränderung der

LVPWd, der IVSd sowie des LVd statt (Abb. 11C). In Übereinstimmung dazu wiesen die transgenen und die wildtypischen Tiere am Ende der Versuchsphase einen ähnlich erhöhten Hypertrophie-Index (Herzgewicht (mg)/Körpergewicht (g)) auf. Dieser betrug in den Mutanten  $8,65 \pm 0,9$  und in den Wildtypen  $7,16 \pm 0,8$ .



**Abb. 11: Funktionelle und morphologische Charakterisierung des Ang II induzierten pathologischen Herzphänotyps adulter  $Dsc2^{-/-}$ -Mäuse.** A) Schematische Übersicht über den zeitlichen Verlauf des Ang II-Versuches. B) Echokardiographie des linken Ventrikels zeigte eine beeinträchtigte Herzfunktion in behandelten  $Dsc2^{-/-}$ -Mäusen (rote Linie). Nach 7 und 14 Tagen Ang II-Applikation wiesen die  $Dsc2$ -defizienten Tiere eine signifikante Reduktion der Verkürzungsfraction (FS) und der Ejektionsfraction (EF) auf. Die Werte der Ang II behandelten Wildtypen (schwarze Linie) lagen im Normalbereich. C) Echokardiographisch ermittelte morphologische Parameter. Beide Versuchstiergruppen entwickelten unter Belastung einen hypertrophen Phänotyp. Nach 14 Tagen Ang II-Behandlung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der diastolischen Hinterwanddicke (LVPWd), der diastolischen Septumdicke (IVSd), des diastolischen linksventrikulären Diameters (LVd) sowie im Herzgewicht (HG)/Körpergewicht (KG)-Verhältnis. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n_{WT}=5$ ;  $n_{KO}=10$ .

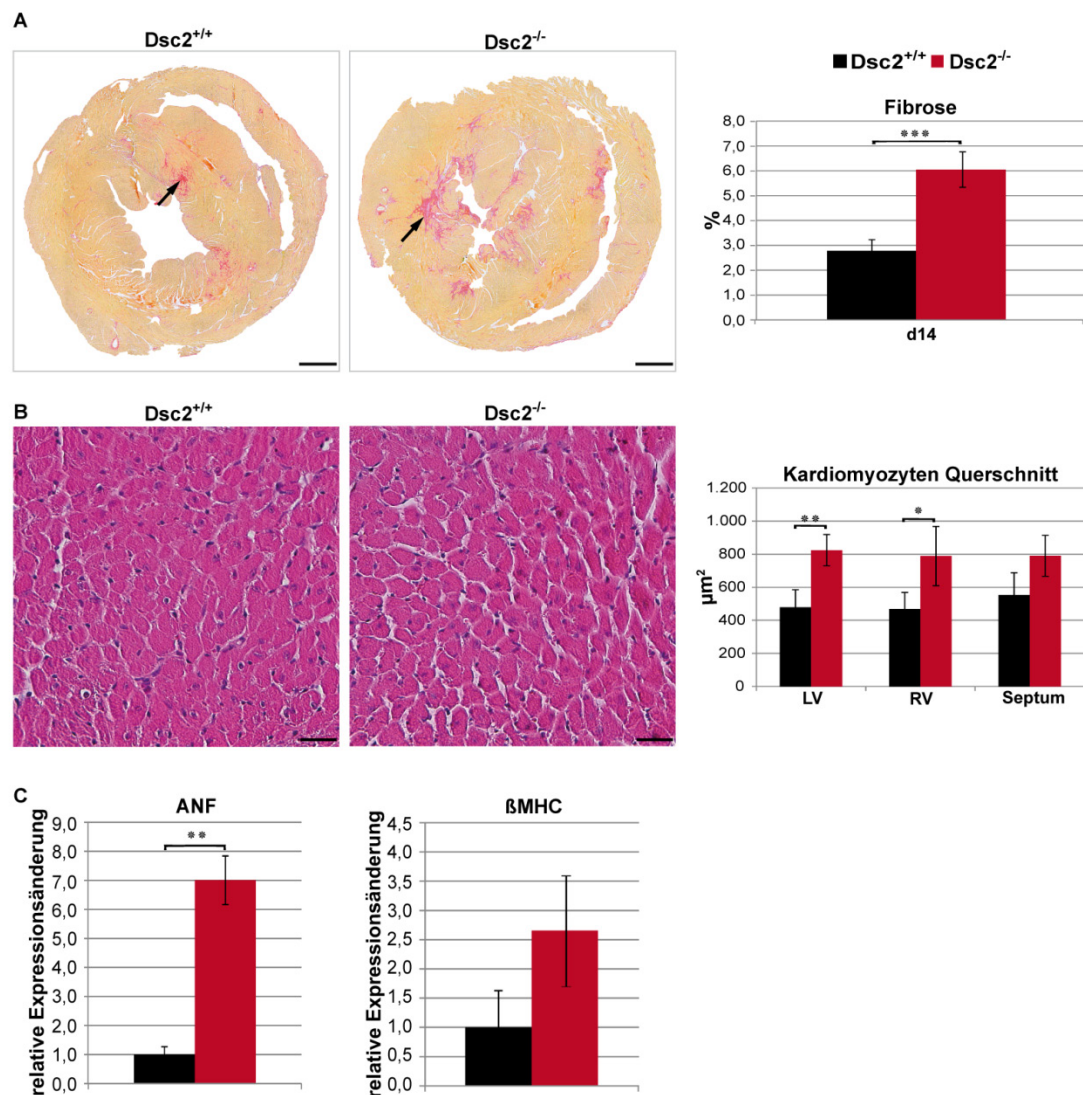
#### 4.4.1.2 Myokardiale Fibrose und erhöhte Expression von Hypertrophiemarkern

Die beobachtete kardiale Dysfunktion deutete eine verminderte Belastungsresistenz in den  $Dsc2^{-/-}$ -Tieren an. Um die Ausprägung des Phänotyps genauer zu charakterisieren, wurden korrespondierende Herzschnitte mittels Sirius Red- und HE-Färbung histopathologisch untersucht. Nach 14 Tagen Ang II war sowohl in den  $Dsc2^{-/-}$  als auch in den  $Dsc2^{+/+}$ -Mäusen eine gegenüber unbehandelten Tieren erhöhte myokardiale Fibrose nachzuweisen. Die Quantifizierung fibrotischer Areale ergab im Vergleich der belasteten Versuchstiergruppen untereinander, eine verstärkte Bindegewebeinlagerung in den  $Dsc2$ -defizienten Herzen (Abb. 12A). Die Fibrose nahm in den Mutanten  $6,04 \pm 0,7\%$  der Gesamtfläche ein, wohingegen der prozentuale Anteil in den Wildtypen bei  $2,78 \pm 0,5\%$  lag. Eine mögliche Erklärung für die fibrotischen Infiltrationen im Myokardium der Knockout-Tiere, wäre u.a. der vorangegangene Zelluntergang durch Apoptose. Die durchgeführten TUNEL-Analysen zur Detektion fragmentierter DNA, lieferten keine Hinweise auf eine gesteigerte Apoptoserate. TUNEL-positive Kardiomyozyten traten sowohl in den Wildtyp- als auch in den transgenen Herzen nur sporadisch auf. Signifikante Unterschiede konnten nicht nachgewiesen werden.

Als ein weiteres Kriterium der Ang II induzierten Belastungsreaktion, wurde die Querschnittsfläche der einzelnen Kardiomyozyten anhand von HE-gefärbten Transversalschnitten bestimmt (Abb. 12B). Unter Belastungsbedingungen zeigte sich in den  $Dsc2^{-/-}$ -Herzen im Vergleich zu wildtypischen Herzen eine Vergrößerung der Kardiomyozyten, welche sowohl im rechten und linken Ventrikel, als auch im Septum zu beobachten war. Die Querschnittsflächen der links- und rechtsventrikulären  $Dsc2^{-/-}$ -Myozyten unterschieden sich mit  $824 \pm 54,3 \mu\text{m}^2$  bzw.  $788,58 \pm 103,4 \mu\text{m}^2$  signifikant von denen der Wildtypen (LV:  $478,75 \pm 91,9 \mu\text{m}^2$ , RV:  $469 \pm 86,5 \mu\text{m}^2$ ). Auf molekularer Ebene lässt sich eine hypertrophe Reaktion u.a. anhand der Reaktivierung des fetalen Genprogramms charakterisieren. Kennzeichnend dafür ist eine verstärkte Bildung sogenannter Hypertrophiemarker im Ventrikel des differenzierten Herzens. In Korrelation zu den funktionellen und histologischen Veränderungen, konnte in den Herzen Ang II behandelte  $Dsc2^{-/-}$ -Tiere eine Re-Induktion ausgewählter Markergene nachgewiesen werden (Abb. 12C). Die Expressionsanalyse mittels QRT-PCR ergab eine Transkriptzunahme des atrial natriuretic factor (ANF), sowie der fetalen Form der myosin heavy chain ( $\beta$ -MHC).



An d14 war die mRNA-Expression der Gene in den Knockout-Tieren um das 7-fache (ANF,  $p=0,002$ ) bzw. um das 2,66-fache ( $\beta$ MHC,  $p=0,51$ ) gegenüber den Wildtyp-Kontrollen erhöht.

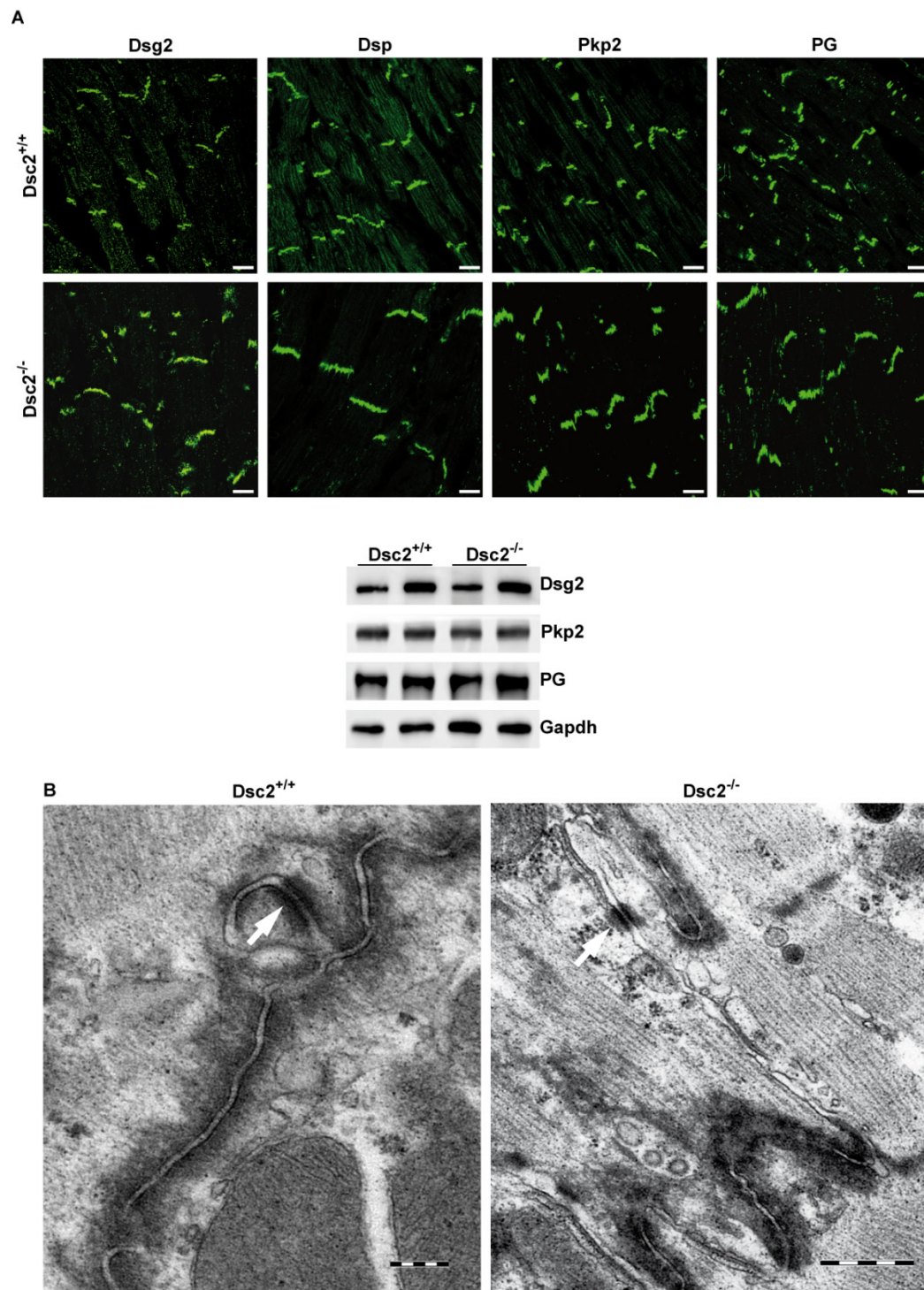


**Abb. 12: Histologische und molekulare Charakterisierung der Ang II induzierten Belastungsreaktion adulter Mausherzen.** A) Sirius Red-Färbung transversaler Herzschnitte nach 14 Tagen Ang II-Applikation. Die fibrotischen Bereiche sind violett-rot gefärbt (schwarze Pfeile) und wurden in Bezug zur Gesamtfläche quantifiziert. Die kardiale Dysfunktion Ang II behandelter Dsc2<sup>-/-</sup>-Tiere (Abb. 11) korrelierte mit einer erhöhten myokardialen Fibrose. Größenbalken: 800 μm; n<sub>WT</sub>=9; n<sub>KO</sub>=18. B) Quantifizierung der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche anhand von HE-gefärbten transversalen Herzschnitten. Ang II führte in Dsc2-defizienten Herzen zu einer signifikanten Größenzunahme der linksventrikulären (LV) und rechtsventrikulären (RV) Kardiomyozyten. Größenbalken: 100 μm. n<sub>WT</sub>=4; n<sub>KO</sub>=9. C) Real-time PCR für die kardialen Hypertrophiemarker ANF und βMHC. Die quantitative Analyse der mRNA-Expression beider Gene zeigte eine Reaktivierung des fetalen Genprogramms in den Herzen Dsc2<sup>-/-</sup>-Tiere infolge der Ang II-Applikation. Schwarze Säulen: Ang II behandelte Wildtyp-Tiere; rote Säulen: Ang II behandelte Knockout-Tiere. Mittelwerte ± SEM; \*  $p < 0,05$ ; \*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .



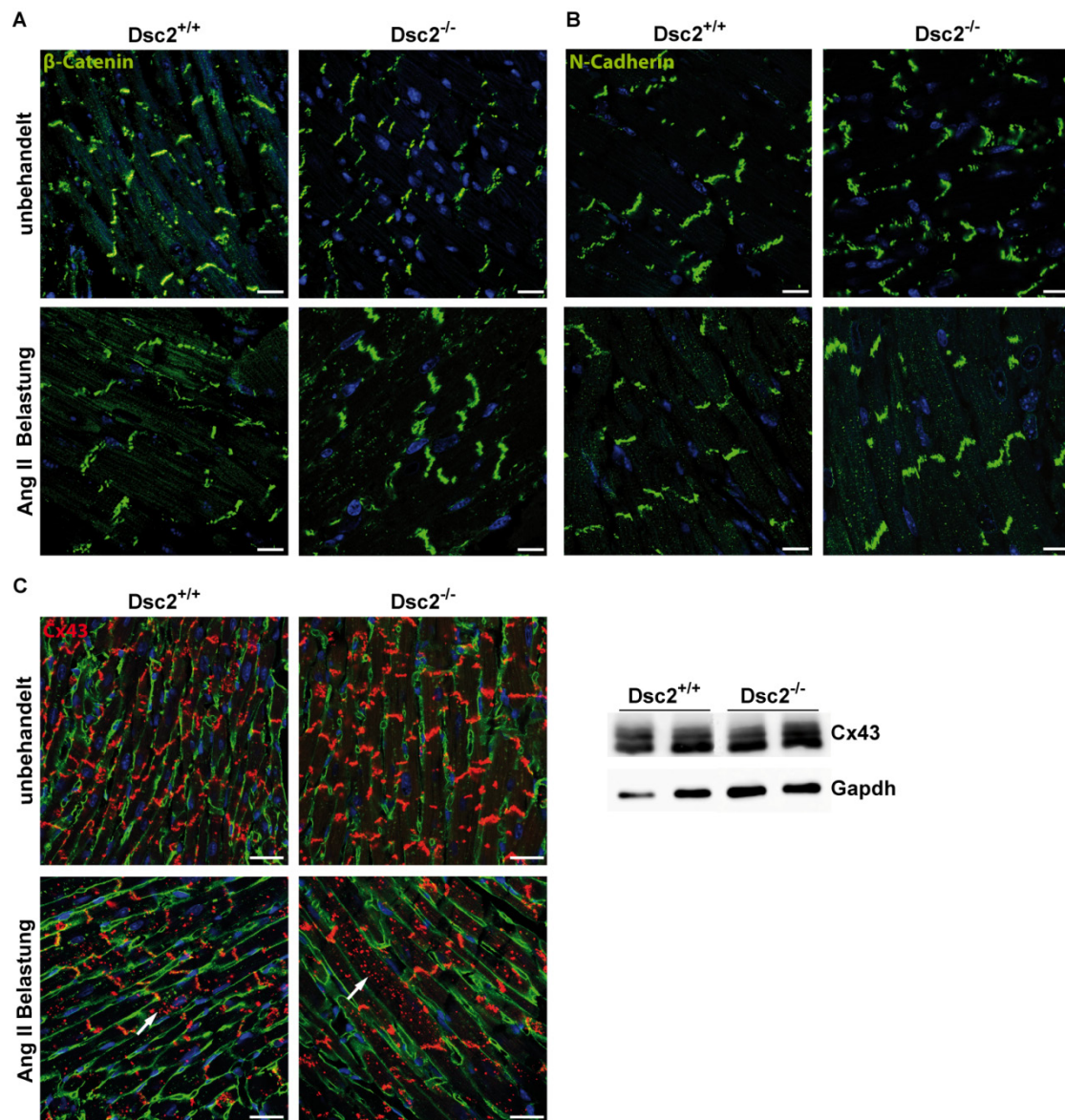
#### 4.4.1.3 Die Zellverbindungen in den Glanzstreifen der Kardiomyozyten – Internalisation von Cx43

Aufgrund der Vermutung, dass der belastungsbedingte kardiale Phänotyp der  $Dsc2^{-/-}$ -Tiere auf eine verminderte desmosomale Integrität zurückzuführen ist, wurde im Folgenden der Einfluss von Ang II auf die Struktur und die Komposition der  $Dsc2$ -defizienten Desmosomen mittels Immunfluoreszenzfärbungen und Westen Blot-Analysen untersucht. Die Desmosomen Ang II behandelter  $Dsc2^{-/-}$ -Herzen wiesen keine Veränderungen in der molekularen Zusammensetzung auf. Wie bereits unter basalen Bedingungen beschrieben, lag ein zu den Wildtypen vergleichbares Expressionsniveau der desmosomalen Proteine Dsg2, Pkp2, Dsp und PG vor, welche regulär an den Glanzstreifen der Kardiomyozyten lokalisierten (Abb. 13A). Auf ultrastruktureller Ebene zeigten sich ebenfalls keine Auffälligkeiten im desmosomalen Erscheinungsbild infolge der Ang II-Applikation. Innerhalb der *Area composita* beider Versuchstiergruppen waren die Desmosomen als klar definierte, hochorganisierte Strukturen zu erkennen und zeichneten sich durch alle Desmosomtypischen ultrastrukturellen Merkmale aus. Zusammen mit den Adhärenzverbindungen traten die Desmosomen mit gleichbleibender Frequenz in den  $Dsc2^{-/-}$ - und  $Dsc2^{+/+}$ -Herzen auf (Abb. 13B).



**Abb. 13: Molekulare Komposition und Ultrastruktur kardialer *Dsc2*-defizienter Desmosomen nach 14 Tagen Ang II.** A) Immunfluoreszenzfärbungen und Western Blots zeigten eine unveränderte Lokalisation und Expression der desmosomalen Proteine Dsg2, Dsp, Pkp2 und PG in den Herzen Ang II behandelter *Dsc2*<sup>-/-</sup>-Tiere. Größenbalken: 75  $\mu$ m B) Elektronenmikroskopische Analyse der Desmosomen innerhalb der Intercalated discs. Ang II hat keinen Einfluss auf die desmosomale Ultrastruktur. Im Myokardium beider Versuchstiergruppen sind die Desmosomen (weißer Pfeil) durch eine dichte Mittellinie und einen elektronendichten zytoplasmatischen Plaque deutlich zu erkennen. Größenbalken: 2  $\mu$ m.

An den Glanzstreifen der Kardiomyozyten stellen die Desmosomen keine eigenständigen, separaten Strukturen dar, sondern bilden mit den Adhärenzverbindungen sowie den Gap junctions ein intermolekulares und funktionelles Netzwerk aus. Demzufolge können sich geringfügige morphologische Veränderungen der desmosomalen Proteine, modifizierend auf die anderen Zellverbindungstypen auswirken. Die Charakterisierung der Intercalated discs erfolgte durch immunhistologische Betrachtungen der Adhärenzverbindungs-Proteine N-Cadherin und  $\beta$ -Catenin, sowie des Gap junction-Proteins Connexin 43 (Cx43). Da die Ang II behandelten  $Dsc2^{-/-}$ -Tiere eine beeinträchtigte Herzfunktion aufwiesen, war insbesondere die Analyse von Cx43 von Interesse, für das zusätzlich eine Rolle in der Pathogenese der ARVC diskutiert wird. Analog zu den Expressionsstudien der desmosomalen Proteine, wurden in den Herzen belasteter  $Dsc2^{-/-}$  und  $Dsc2^{+/+}$ -Tiere gleichbleibende Immunfluoreszenz-Signale für N-Cadherin und  $\beta$ -Catenin an den Intercalated discs detektiert (Abb. 14A, B). Für Connexin 43 lag ebenfalls kein verändertes Expressions- oder Phosphorylierungsniveau vor. Sowohl die Ang II behandelten  $Dsc2^{-/-}$ -Tiere als auch die  $Dsc2^{+/+}$ -Kontrollen wiesen in Immunfluoreszenz- und ergänzend durchgeführten Western Blot-Analysen eine konstante Proteinexpression auf (Abb. 14C). Dahingegen, konnte in beiden Genotypen eine Delokalisation von Cx43 nachgewiesen werden. Während unter basalen Bedingungen Cx43 ausschließlich an den Zellgrenzen innerhalb des kardialen Zellverbindungskomplexes lokalisierte, fand infolge der Ang II-Applikation eine partielle Internalisierung des Proteins statt. Dabei zeigte sich die zytoplasmatische Cx43-Färbung überwiegend in den Kardiomyozyten  $Dsc2$ -defizienter Ang II-Herzen und trat im gesamten Querschnitt auf. In den WT-Kontrollen waren dagegen nur wenige Areale betroffen.

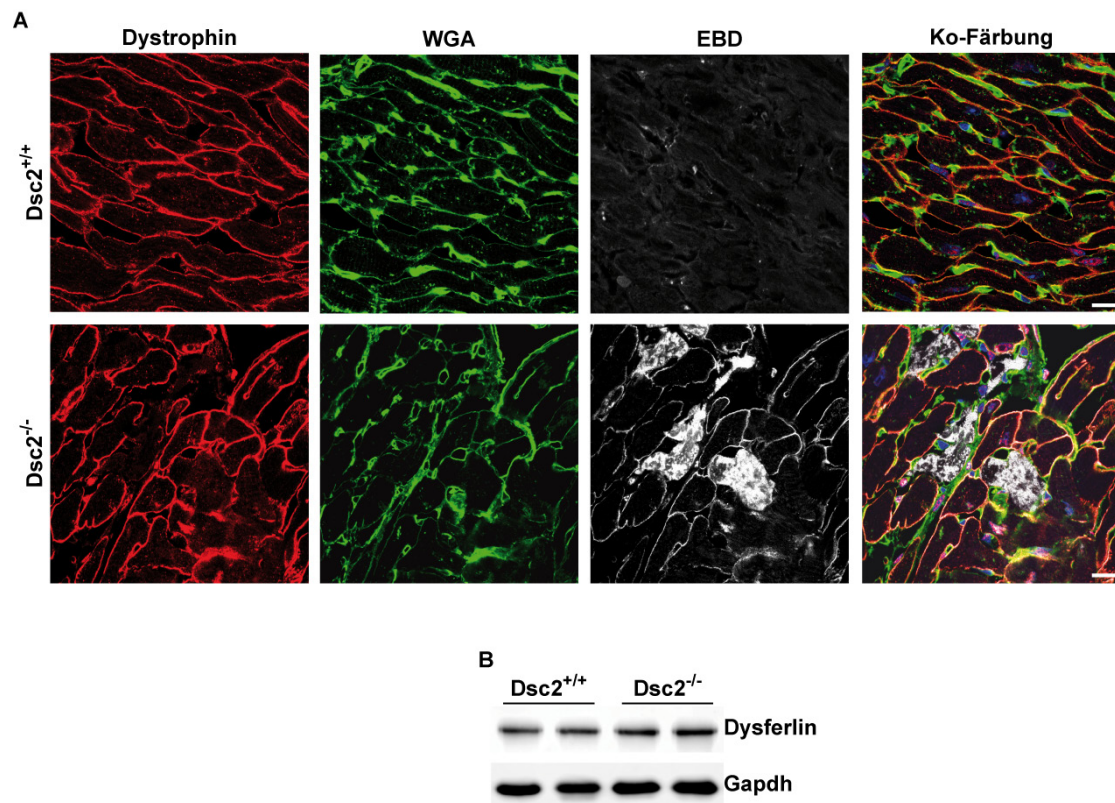


**Abb. 14: Molekulare Komposition der Adhärenzverbindungen und Gap junctions in den Herzen adulter, Ang II behandelter *Dsc2*<sup>-/-</sup>-Tiere.** A, B) Immunfluoreszenzfärbungen für β-Catenin (A) und N-Cadherin (B) auf Kryoschnitten kardialen Gewebes Ang II behandelte Versuchstiere im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen. Die Adhärenzverbindungs-Proteine lokalisierten regulär an den Intercalated discs der Kardiomyozyten. Größenbalken: 75 μm C) Immundetektion des Gap junction-Proteins Connexin 43 (Cx43). Unter basalen Bedingungen war ein positives Fluoreszenzsignal (rot) ausschließlich innerhalb der Glanzstreifen zu detektieren. Infolge der Ang II-Applikation fand eine partielle Internalisation statt, welche in den *Dsc2*<sup>-/-</sup>-Tieren überwog (weiße Pfeile). Grün: Wheat germ agglutinin-Färbung der Zellmembran. Größenbalken: 25 μm. Die Western Blot-Analysen wurden mit kardialen Proteinextrakten der Ang II behandelten Mäuse durchgeführt. Es zeigte sich keine differentielle Proteinexpression von Cx43.

#### 4.4.1.4 Aufrechterhaltung der zellulären Integrität Dsc2<sup>-/-</sup>-Kardiomyozyten

Der hochorganisierte molekulare Aufbau der Desmosomen ist die Grundlage für die Ausbildung adhäsiver Zellkontakte. Der Verlust von Dsc2 könnte somit einen Einfluss auf die desmosomale Adhäsivität haben. Deshalb konnte davon ausgegangen werden, dass vor allem unter erhöhter Belastung die zelluläre Stabilität nicht aufrechterhalten werden kann. Um den Einfluss von Ang II auf die strukturelle Integrität der Dsc2-defizienten Kardiomyozyten zu untersuchen, wurde eine Analyse des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes (DGC) durchgeführt. Der DGC stellt eine Verbindung zwischen dem Aktin-Zytoskelett und der extrazellulären Matrix her und ist somit für Stabilität des Sarkolemms von entscheidender Bedeutung. Innerhalb des Komplexes fungiert Dystrophin als Bindeglied zwischen F-Aktin und dem Zelladhäsionsrezeptor Dystroglykan, wodurch eine gleichmäßige Übertragung der Kontraktionskräfte auf das Sarkolemm ermöglicht wird. Der Verlust des DGC-Signals ist daher ein Indikator für einen Integritätsverlust der Zellmembran infolge verstärkter Schärkräfte. Eventuell auftretende Läsionen der Zellmembran wurden mit Hilfe des membranimpermeablen Farbstoffs Evans Blue (EBD) analysiert. Die repräsentativen Immunfluoreszenzfärbungen von Dystrophin zeigten keine belastungsbedingten Veränderungen des DGC in den Herzen Dsc2<sup>-/-</sup> und Dsc2<sup>+/+</sup>-Tiere (Abb. 15A). Im gesunden Myokardium beider Versuchstiergruppen wurde eine einheitlich positive Färbung der Zellmembran deutlich, die auch in den fibrotischen Bereichen der Dsc2<sup>-/-</sup>-Herzen überwog. Ein Verlust des Dystrophin-Signals war in nur wenigen, vereinzelt auftretenden Dsc2<sup>-/-</sup>-Kardiomyozyten zu beobachten und korrelierte mit einer verminderten Integrität des Sarkolemms. EBD akkumulierte ausschließlich im Zytoplasma der Dystrophin-negativen Zellen Dsc2-defizienter Herzen. In keinem Kardiomyozyten mit einem intakten DGC war ein positives EBD-Signal zu detektieren. Der fehlende Nachweis von erhöhten Membraneinrissen könnte möglicherweise auf eine verstärkte Aktivierung von Reparaturmechanismen zurückzuführen sein. Aufgrund dessen wurden Expressionsstudien von Dysferlin, einem muskelspezifischen Reparaturprotein, durchgeführt. In den Ang II behandelten Knockout-Herzen konnten keine verstärkten Regenerationsprozesse nachgewiesen werden. Die Western Blot-Analysen zeigten im Vergleich der beiden behandelten Versuchstiergruppen untereinander keine Veränderungen in der kardialen Dysferlin-Expression (Abb. 15B).



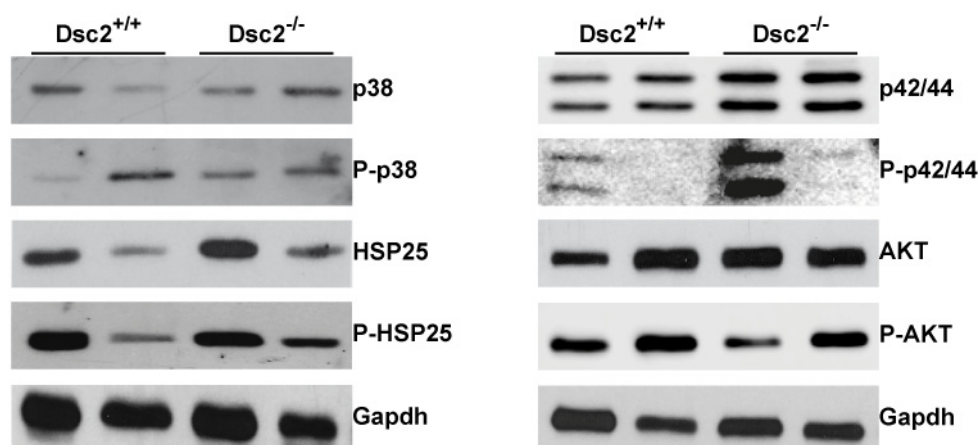


**Abb. 15: Aufrechterhaltung der zellulären Integrität in Ang II behandelten *Dsc2*<sup>-/-</sup>-Kardiomyozyten.** A) Immunfluoreszenzmarkierung von Dystrophin (rot) auf Herzschnitten belasteter und mit EBD injizierter Mäuse. Die WT-Herzen zeigten eine einheitlich positive Dystrophin-Färbung der mit wheat germ agglutinin (WGA, grün) markierten Zellmembran. Im Myokardium *Dsc2*<sup>-/-</sup>-Tiere waren nur wenige, vereinzelt auftretende Dystrophin-negative Zellen zu beobachten. Der Verlust von Dystrophin korrelierte mit einer verminderten Membranintegrität, gekennzeichnet durch ein positives EBD-Signal. Größenbalken: 75  $\mu$ m B) Western Blot-Analyse des muskelspezifischen Reparaturproteins Dysferlin. Die *Dsc2*<sup>-/-</sup>-Tiere wiesen keine verstärkte Aktivierung von Reparaturprozessen auf. Die kardiale Dysferlin-Expression war in beiden Genotypen gleich stark.

#### 4.4.1.5 Keine Veränderungen in klassischen Hypertrophie-assoziierten Signalwegen

Im Verlauf einer Myokardhypertrophie wird die Ausprägung des pathologischen Phänotyps u.a. durch die Aktivierung spezifischer Signalwege bedingt. Deshalb war im Weiteren von Interesse, ob die erhöhte myokardiale Fibrose und die beeinträchtigte Pumpfunktion der *Dsc2*<sup>-/-</sup>-Tiere mit einer hypertrophen Signaltransduktion korrelierte. Bei der durch mechanische Belastung induzierten Hypertrophie sind zwei Hauptsignalwege von zentraler Bedeutung: der Mitogen-activated protein kinase (MAPK)-Signalweg und der Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT (PI3/AKT)-Signalweg. Die Charakterisierung dieser Signalkaskaden

erfolgte anhand der Schlüsselmoleküle p42/44 (ERK1/2), p38, HSP25 und AKT, deren basale sowie aktivierte, phosphorylierte Formen mittels Western Blot analysiert wurden (Abb. 16). Im Hinblick auf die Aktivierung der oben genannten Signaltransduktionswege, ließen sich anhand der durchgeführten Expressionsstudien keine Unterschiede zwischen den belasteten  $Dsc2^{-/-}$  und  $Dsc2^{+/+}$ -Tieren nachweisen. Die Ang II behandelten  $Dsc2^{-/-}$ -Herzen wiesen eine zu den Wildtyp-Herzen vergleichbare Grundexpression und Proteinphosphorylierung von p42/44, p38, HSP25 und AKT auf.



**Abb. 16:** Analyse kardialer Hypertrophie-Signalwege in Ang II behandelten  $Dsc2^{-/-}$ -Tieren. Western Blots gegen p38, Phospho-p38, HSP25, Phospho-HSP25, p42/44, Phospho-p42/44, AKT und Phospho-AKT zeigten im Vergleich zu behandelten WT-Kontrollen keine Aktivierung des MAPK- und des PI3/AKT-Signaltransduktionsweges in den Herzen Ang II behandelter  $Dsc2$ -defizienter Tiere.

#### 4.4.2 Thorakales Aortenbanding (TAC)

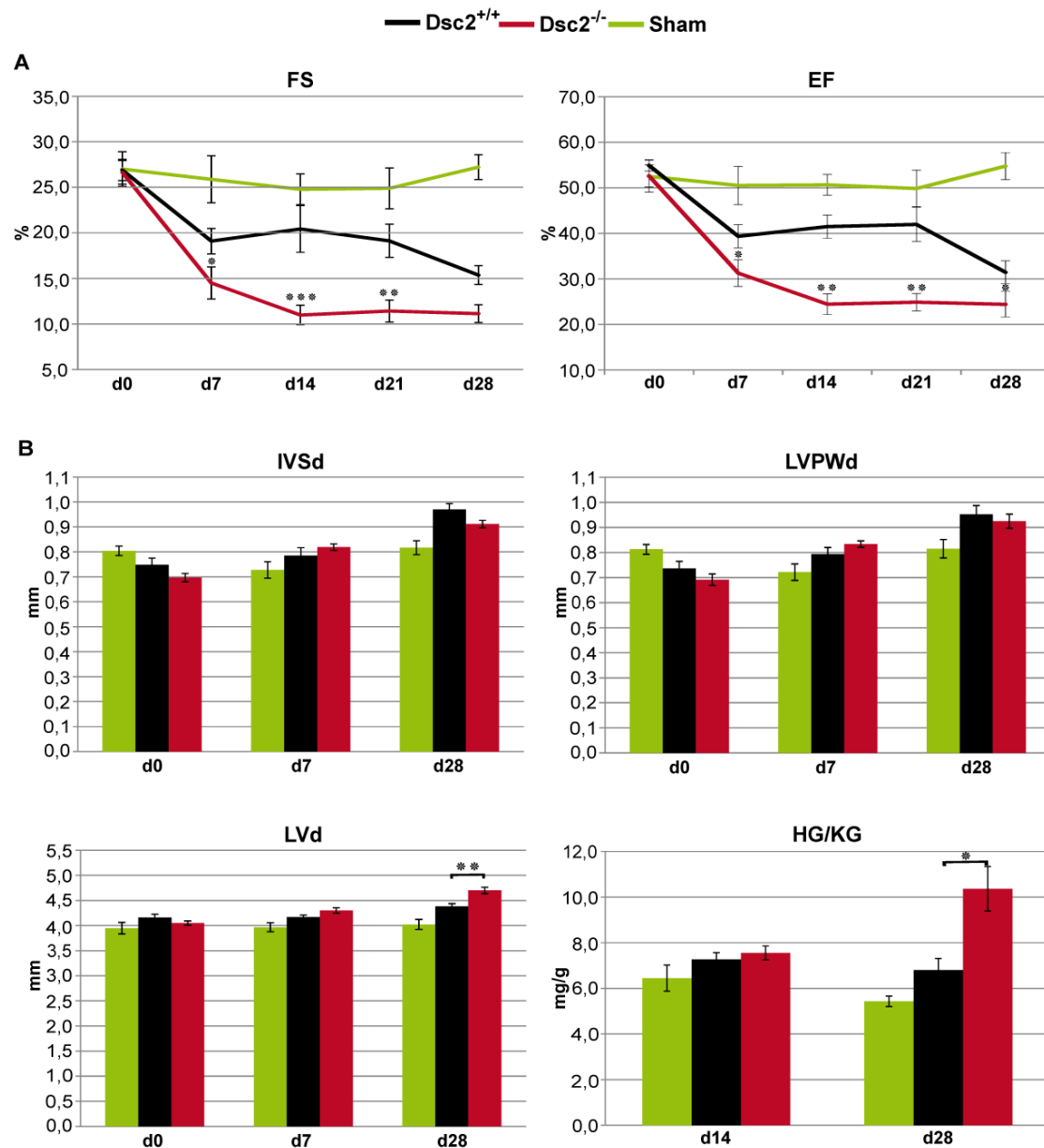
##### 4.4.2.1 Pathologischer Herzphänotyp in $Dsc2^{-/-}$ -Tieren

In den vorangegangenen Analysen konnte eine verminderte Belastungsresistenz der  $Dsc2^{-/-}$ -Herzen aufgezeigt werden. Um dies in einem zweiten Modell zu bestätigen, wurden die Tiere einer operativen Aortenkonstriktion (TAC) unterzogen. Das Aortenbanding ist ein etabliertes Modell zur Induktion kardialer Hypertrophie. Im Gegensatz zur Ang II-Applikation bietet die Einengung der Aorta den Vorteil, metabolische Nebenwirkungen, wie sie für Ang II nachgewiesen wurden, ausschließen zu können. Ang II hat beispielsweise eine regulatorische Funktion auf Wachstumsfaktoren, Cytokine und Chemokine, die Vorgänge wie Wachstum, Apoptose, Fibrose und Inflammation steuern. Beim Aortenbanding wird der

Durchmesser der thorakalen Aorta um ca. 50% mit Hilfe einer Ligatur verengt, sodass die Nachlast und die Pumpfunktion des Herzens erhöht wird. Die induzierte Stenose wurde an 8 Wochen alten Knockout- und Wildtyp-Tieren durchgeführt. Eine Gruppe Schein-operierter  $Dsc2^{-/-}$ -Mäuse (Sham), ohne Banding, diente als Kontrolle um eventuelle Einflüsse der Operationstechnik auszuschließen. Damit der pathologische Phänotyp in seinem Verlauf beobachtet und detaillierter analysiert werden konnte, erfolgten vor der Operation (d0), sowie 7, 14, 21, und 28 Tage nach der Operation (d7-d28) echokardiographische Untersuchungen der kardialen Funktion und Morphologie. Analog zum Ang II-Modell wurde das Auftreten von Herzinsuffizienzbefunden anhand der linksventrikulären Parameter FS, EF, LVPWd, IVSd und IVD untersucht. Ergänzend dazu erfolgte zum Zeitpunkt d14 und d28 eine Analyse des Hypertrophie-Indexes. Hierzu wurden die Herzen präpariert und das Herzgewicht im Bezug zum Körpergewicht korreliert. In allen analysierten Tieren konnte mittels Echokardiographie eine effiziente Ligatur der Aorta bestätigt werden. Den Erwartungen entsprechend, zeigten die WT-Tiere infolge der erhöhten kardialen Belastung Anzeichen einer milden Herzinsuffizienz. Über den gesamten Versuchsverlauf konnte eine mäßig progressive Reduktion der linksventrikulären Leistung beobachtet werden. Die funktionellen Parameter FS und EF nahmen von basalen  $26,9 \pm 1,2\%$  (FS) bzw.  $54,9 \pm 1,2\%$  (EF) auf  $20,4 \pm 2,6\%$  bzw.  $41,5 \pm 2,6\%$  an d14 und auf  $15,4 \pm 1,0\%$  bzw.  $31,5 \pm 2,5\%$  an d28 ab (Abb. 17A). Demgegenüber entwickelten die  $Dsc2^{-/-}$ -Tiere unter chronischer Druckbelastung eine starke Herzinsuffizienz, welche sich durch eine rasche Abnahme der Pumpfunktion, eine Größenzunahme der Wanddicken und eine Dilatation des linken Ventrikels charakterisierte. Im Gegensatz zu den Wildtypen trat der maximal beobachtete Funktionsverlust der  $Dsc2^{-/-}$ -Herzen bereits an d14 auf. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der FS und EF von  $26,6 \pm 1,3\%$  (FS) bzw.  $52,6 \pm 2,4\%$  (EF) auf  $11,0 \pm 1,1\%$  (FS) bzw.  $24,4 \pm 2,3\%$  (EF). Die  $Dsc2^{-/-}$ -Tiere wiesen jedoch keine erhöhte Mortalität auf. In Korrelation zu den Funktionsstörungen bedingte die hämodynamische Belastung sowohl in den  $Dsc2^{+/+}$  als auch in den  $Dsc2^{-/-}$ -Tieren die Entstehung einer kardialen Hypertrophie. Diese zeigte sich durch eine Zunahme der kardialen Wanddicken und des linksventrikulären Diameters (Abb. 17B). Im Gegensatz zum Ang II-Modell ergaben sich Unterschiede zwischen beiden TAC-operierten Versuchstiergruppen. Innerhalb der ersten Woche nahmen IVSd und LVPWd der  $Dsc2^{-/-}$ -Herzen von  $0,7 \pm 0,01$  mm bzw.  $0,7 \pm 0,02$  mm auf  $0,82 \pm 0,01$



mm bzw.  $0,83 \pm 0,01$  mm zu. Ein entsprechender Anstieg der Wanddicken konnte in den WT-Tieren erst im Verlauf der zweiten Versuchshälfte detektiert werden. Nach vier Wochen betrugen IVSd und LVPWd in den Wildtypen  $0,97 \pm 0,02$  mm bzw.  $0,95 \pm 0,04$  mm und in den Mutanten  $0,91 \pm 0,01$  mm bzw.  $0,93 \pm 0,03$  mm. Dagegen war über den gesamten Versuchszeitraum eine kontinuierliche und im Vergleich zu den Kontrollen verstärkte Dilatation des linken Ventrikels Dsc2<sup>-/-</sup>-Herzen auszumachen. TAC führte zu einem signifikanten Anstieg des Diameter von  $4,05 \pm 0,04$  mm auf  $4,7 \pm 0,06$  mm an d28, wohingegen er sich in Wildtyp-Herzen von  $4,16 \pm 0,06$  mm auf lediglich  $4,38 \pm 0,06$  mm vergrößerte. Die mittels Echokardiographie aufgezeigte Gewichtszunahme der transgenen Herzen wurde durch die Analyse des Hypertrophie-Index an d28 bestätigt (Abb. 17B). Dieser lag in den Mutanten bei  $10,36 \pm 1,0$ . Die stenosierten Wildtypen hingegen wiesen einen Index von  $6,8 \pm 0,5$  und die Scheinoperierten Tiere einen Index von  $5,4 \pm 0,1$  auf.

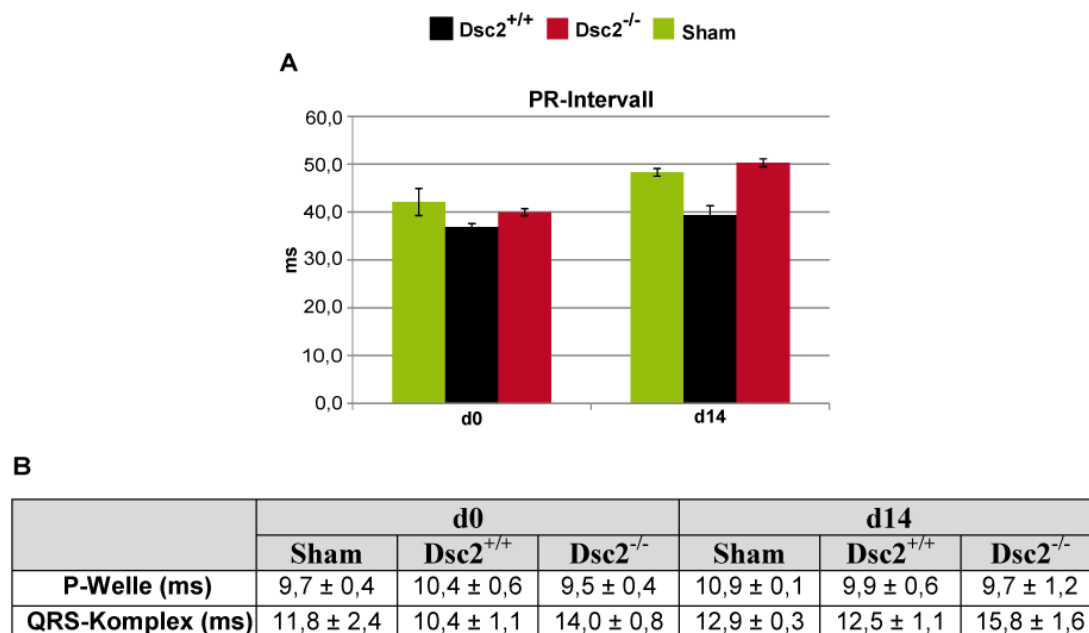


**Abb. 17: Untersuchung funktioneller und morphologische Parameter Dsc2<sup>-/-</sup>-Herzen nach TAC.**

A) Zeitlicher Verlauf der linksventrikulären Leistung. Echokardiographische Überwachung von EF und FS ergab einen signifikanten Funktionsverlust der Dsc2<sup>-/-</sup>-Herzen innerhalb der ersten 14 Tage nach TAC. p: KO vs. WT. B) Morphologische Charakterisierung der kardialen Hypertrophie mittels Echokardiographie und Hypertrophie-Index (Herzgewicht/Körpergewicht). Bereits nach 7 Tagen wiesen die Dsc2<sup>-/-</sup>-Tiere im Vergleich zu den Wildtypen eine stärkere Vergrößerung der IVSd und der LVPWd auf. Auffällig war die über den gesamten Versuchszeitraum signifikante Dilation des linken Ventrikels (LVd) der Dsc2<sup>-/-</sup>-Herzen. Der Hypertrophie-Index an d28 bestätigte eine signifikante Gewichtszunahme der transgenen Herzen. Grün: Sham-Tiere. Schwarz: WT-Tiere. Rot: Dsc2<sup>-/-</sup>-Tiere. Mittelwerte ± SEM; \* p < 0,05; \*\* p ≤ 0,01; \*\*\* p ≤ 0,001 ; n<sub>Sham</sub>=8 (d7, 14), 6 (d21, 28); n<sub>WT</sub>= 9 (d7, 14), 5 (d21, 28); n<sub>KO</sub>=11 (d7, 14), 5 (d21, 28).

#### 4.4.2.2 Elektrophysiologische Veränderungen der Dsc2<sup>-/-</sup>-Herzen

Bei der kardialen Hypertrophie kommt es häufig zu einem sogenannten elektrischen Remodeling. Dieses beschreibt die stattfindenden Veränderungen in den elektrischen Eigenschaften des Herzens, die das Auftreten von Rhythmusstörungen begünstigen. Um die Auswirkungen der TAC-induzierten chronischen Druckbelastung auf die kardiale Erregungsleitung und -ausbreitung in den belasteten Tieren zu untersuchen, wurden an d0 sowie an d14 Oberflächen-EKGs über die Extremitäten narkotisierter Mäuse abgeleitet. Die Beurteilung der elektrischen Herzaktivität erfolgte anhand der Dauer des PR-Intervalls, der P-Welle und des QRS-Komplexes. Die statistische Analyse der Daten ergab für keinen der EKG-Parameter signifikante Veränderungen. Dennoch konnte anhand des PR-Intervalls in den Dsc2<sup>-/-</sup>-Tieren eine im Vergleich zu den Sham- und den WT-Kontrollen verlängerte atrioventrikuläre Überleitungszeit nach TAC dokumentiert werden. Diese erhöhte sich um 26% von  $40,0 \pm 0,7$  ms (d0) auf  $50,3 \pm 0,8$  ms (d14), wohingegen in den Kontrollgruppen ein deutlich geringerer Anstieg um durchschnittlich 11% von  $42,09 \pm 2,8$  ms (Sham) bzw.  $36,8 \pm 0,7$  ms (WT) auf lediglich  $48,3 \pm 0,8$  ms (Sham) bzw.  $39,4 \pm 1,9$  ms (WT) stattfand. Besonders auffällig war des Weiteren das Auftreten von Arrhythmien in Form eines AV-Blocks II. Grades in einem KO-Tier. In den Wildtypen als auch in den Scheinoperierten Tieren ließ sich durchgängig ein regelmäßiger Sinusrhythmus nachweisen. Im Gegensatz dazu zeigten sich keine Unterschiede in der Dauer der P-Welle und des QRS-Komplexes zwischen den Versuchstiergruppen. Sham-, Dsc2<sup>+/+</sup>- und Dsc2<sup>-/-</sup>-Tiere wiesen nach 14 Tagen TAC einen geringfügig verlängerten, miteinander vergleichbaren QRS-Komplex auf. Die Dauer der P-Welle blieb unverändert.

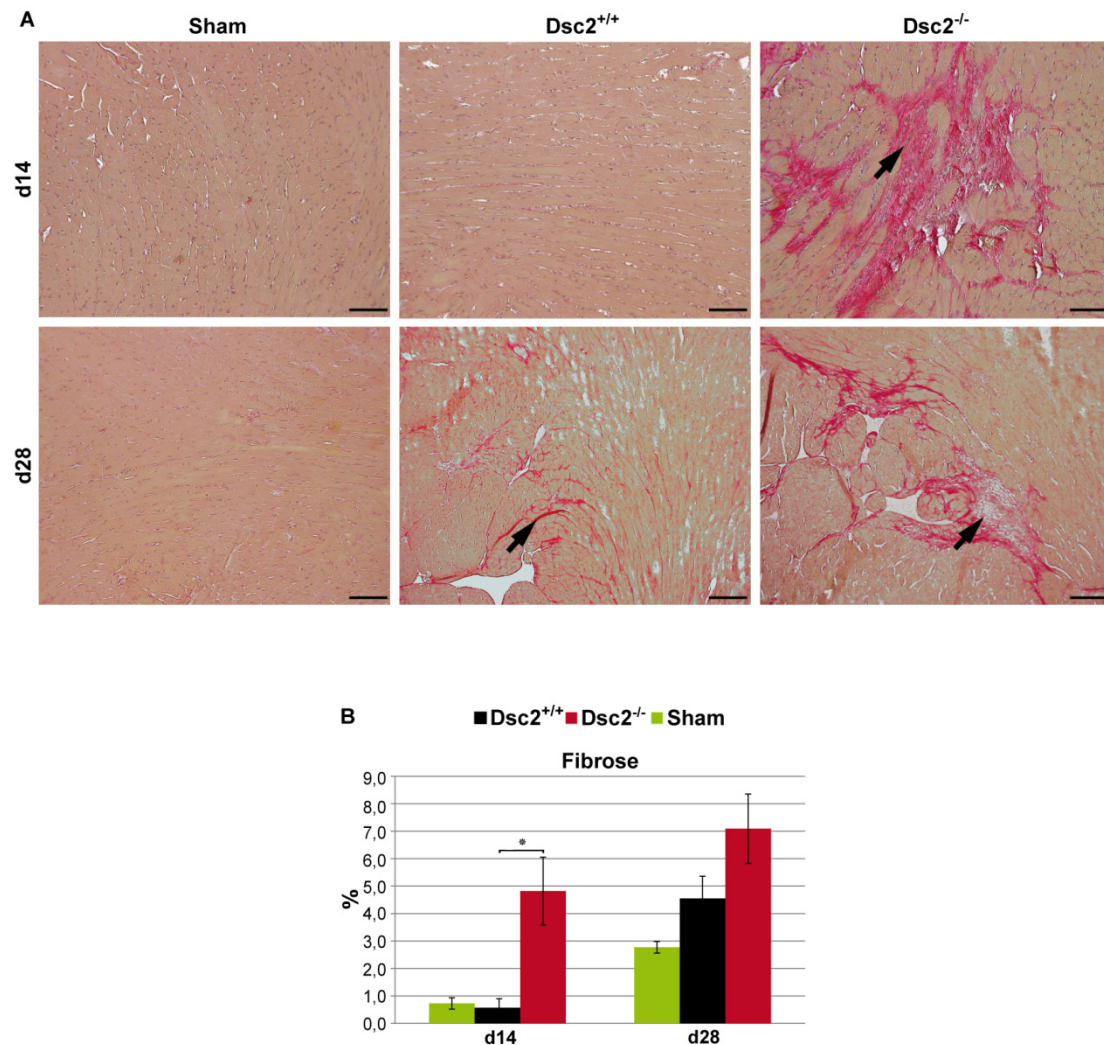


**Abb. 18: EKG-Ableitungen zur Analyse der elektrischen Herzaktivität nach TAC.** A) Die Analyse des PR-Intervalls an d14 nach der Stenose ergab im Vergleich zu den Sham und den WT-Kontrollen eine Verlängerung der atrioventrikulären Überleitungszeit in den Dsc2<sup>-/-</sup>-Tieren. B) In der Dauer der P-Welle und des QRS-Komplexes zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen. Mittelwerte ± SEM; n<sub>Sham</sub>=2; n<sub>WT</sub>=4; n<sub>KO</sub>=5.

#### 4.4.2.3 Myokardiale Fibrosierung und erhöhte Expression von Hypertrophiemarkern

Die Ergebnisse der transthorakalen Echokardiographie zeigten die Induktion eines progressiven, pathologischen Herzphänotyps in Dsc2<sup>-/-</sup>-Mäusen nach TAC. Zur näheren Untersuchung der hypertrophen Belastungsreaktion wurden die Herzen nach 14 und 28 Tagen präpariert und histologisch analysiert. Mittels Sirius Red-Färbung ließen sich im Vergleich zu den Sham-Kontrollen in beiden TAC-operierten Versuchstiergruppen fibrotische Veränderungen darstellen (Abb. 19A). Der prozentuale Anteil der kollagenen Bereiche im Bezug zur Gesamtfläche lag dabei im Myokardium der transgenen Tiere signifikant über dem der WT-Hezen und betrug an d14  $2,5 \pm 1,2\%$  und an d28  $7,1 \pm 1,3\%$ . Dies entsprach einer 6,6 bzw. 2,6-fach erhöhten Fibrose gegenüber der Schein-operierten Kontrollgruppe, in denen sich ein Anteil von  $0,7 \pm 0,2\%$  (d14) bzw.  $2,8 \pm 0,2\%$  (d28) ergab. Dahingegen wiesen die Wildtypen mit  $0,6 \pm 0,3\%$  (d14) bzw.  $4,6 \pm 0,8\%$  (d28) keine bzw. eine Erhöhung um das 1,6-fache auf (Abb. 19B).

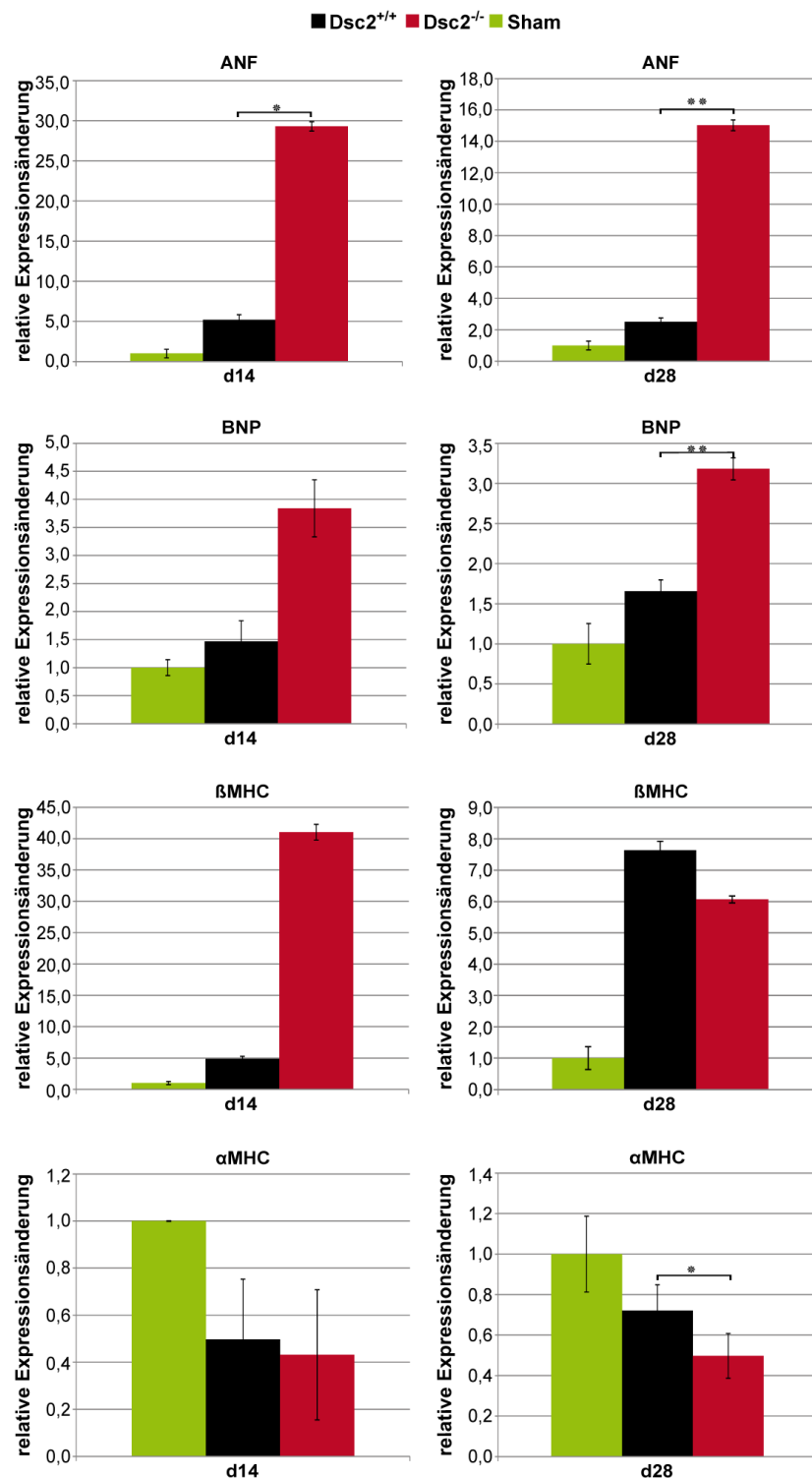
Im Zusammenhang mit der beobachteten Bindegewebsbildung wurden TUNEL-Assays zur Analyse des programmierten Zelltodes durchgeführt. Es konnte keine erhöhte Apoptose in den  $Dsc2^{-/-}$ -Herzen detektiert werden. Sowohl an d14 als auch an d28 zeigte sich in beiden Genotypen eine gleich hohe Rate TUNEL-positiver Zellen.



**Abb. 19: Analyse der myokardialen Fibrose nach TAC.** A) Sirius Red-Färbungen von Paraffinschnitten zeigten massive fibrotische Veränderungen (Pfeile) in den  $Dsc2^{-/-}$ -Herzen nach 14 und 28 Tagen TAC. Größenbalken: 100  $\mu$ m. B) Die Quantifizierung der fibrotischen Areale in Bezug zur Gesamtfläche ergab eine signifikant erhöhte Kollageneinlagerung in  $Dsc2^{-/-}$ -Tieren im Vergleich zu Sham- und WT-Kontrollen. Mittelwerte  $\pm$  SEM; \*  $p < 0,05$ .

Neben der myokardialen Fibrosierung wurde im Weiteren die Re-Induktion fetaler Gene als ein weiteres Kennzeichen der Herzinsuffizienz auf Transkriptionsebene bestimmt. Die Untersuchung der mRNA-Expression der Hypertrophiemarker ANF, BNP (brain natriuretic peptide) und  $\beta$ MHC erfolgte mittels QRT-PCR nach 14 bzw. 28-tägiger Versuchsdauer (Abb. 20). Sowohl für ANF als auch für BNP war an d14

bzw. an d28 eine signifikant erhöhte Expression in den Herzen Dsc2-defizienter Mäuse nachweisbar. Im Vergleich zu den Sham-Kontrollen zeigte sich eine  $29,3 \pm 0,6$ -fach (d14) bzw.  $15,0 \pm 0,3$ -fach (d28) stärkere ANF-Expression und eine  $3,8 \pm 0,5$ -fach (d14) bzw.  $3,2 \pm 0,1$ -fach (d28) stärkere BNP-Expression. In den WT hingegen lag eine geringere Transkriptzunahme um das  $5,2 \pm 0,6$  und  $2,5 \pm 0,2$ -fache (ANF) bzw. um das  $1,5 \pm 0,4$  und  $1,7 \pm 0,1$ -fache (BNP) vor. Die Analyse von  $\beta$ MHC ergab ebenfalls eine TAC bedingte Zunahme in der Transkriptmenge. Eine differentielle Genexpression zwischen den Dsc2<sup>-/-</sup> und Dsc2<sup>+/+</sup>-Tieren konnte jedoch lediglich an d14 festgestellt werden. Nach 14-tägiger Aortenkonstriktion war die kardiale  $\beta$ MHC-Expression in den Mutanten um das  $41,0 \pm 1,3$ -fache gegenüber den Schein-operierten Mäusen und um das  $9,5 \pm 1,3$ -fache gegenüber den Wildtypen erhöht. An d28 wiesen beide stenosierte Versuchstiergruppen ein ähnliches relatives Expressionsniveau um das  $6,1 \pm 0,1$ -fache (Dsc2<sup>-/-</sup>) bzw.  $7,6 \pm 0,3$ -fache (Dsc2<sup>+/+</sup>) auf. Grundlage für die Re-Expression von  $\beta$ MHC ist häufig ein Isoformen-Switch von der adulten  $\alpha$ MHC-Form zur fetalen  $\beta$ MHC-Form. Dies äußert sich durch die Zunahme von  $\beta$ MHC, bei einer gleichzeitigen Abnahme von  $\alpha$ MHC. Der verstärkten Expression von  $\beta$ MHC entsprechend, fand unter erhöhter Druckbelastung eine Reduktion des Differenzierungsmarkers  $\alpha$ MHC statt. In den Dsc2<sup>-/-</sup>-Herzen konnte in Bezug zu den Sham-Tieren eine  $0,4 \pm 0,3$ -fache (d14) bzw.  $0,5 \pm 0,1$ -fache (d28) und in den Dsc2<sup>+/+</sup>-Herzen eine  $0,5 \pm 0,3$ -fache (d14) bzw.  $0,7 \pm 0,1$ -fache (d28) mRNA-Expression detektiert werden.

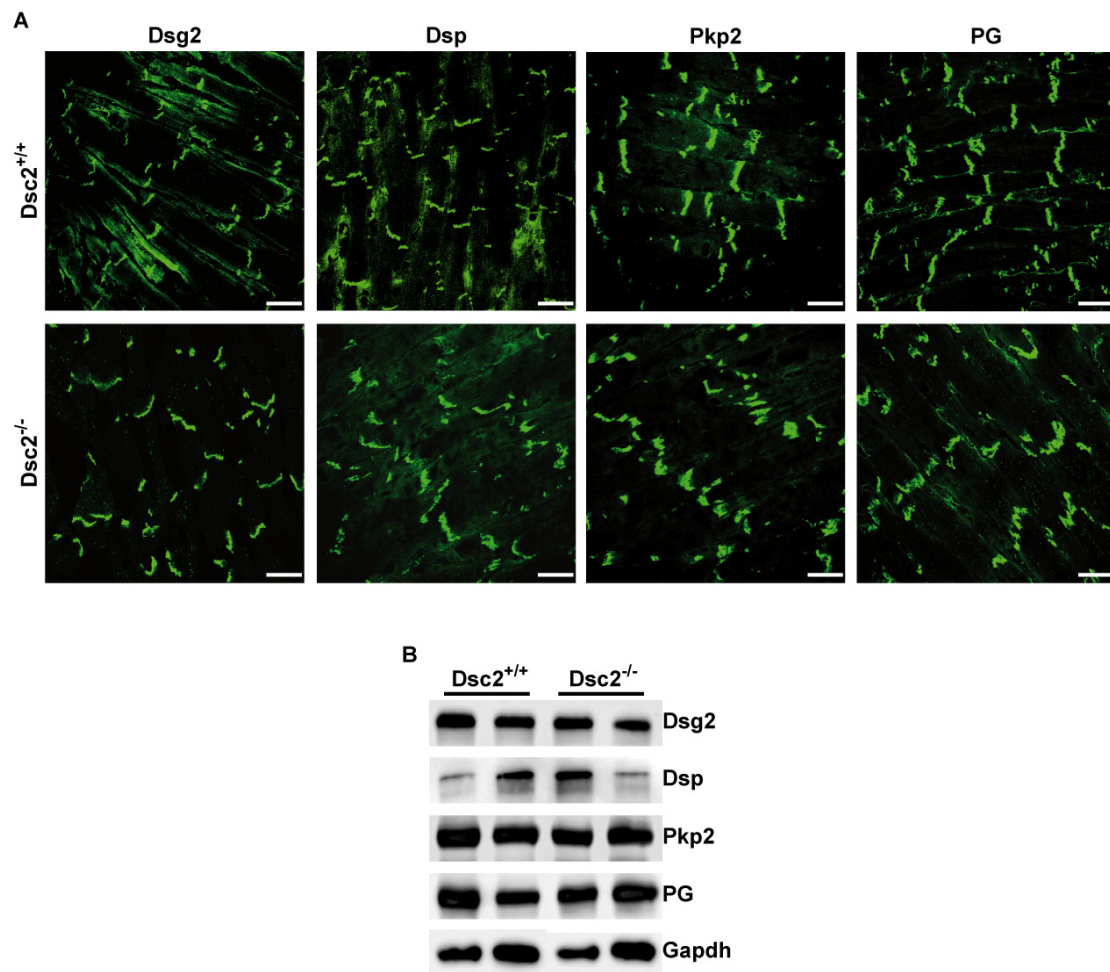


**Abb. 20: Kardiale mRNA-Expression von Hypertrophiemarkern nach Aortenkonstriktion.** QRT-PCR-Analysen von ANF, BNP und  $\beta$ MHC ergaben in den Dsc2<sup>-/-</sup>-Tieren im Vergleich zu den Sham- und den WT-Kontrollen eine erhöhte Expression aller drei Markergene nach 14 Tagen TAC. An d28 wiesen nur ANF und BNP eine erhöhte Transkriptmenge auf. In Korrelation zur Re-Aktivierung des fetalen Genprogramms fand unter erhöhter Druckbelastung sowohl an d14 als auch an d28 eine Reduktion des Differenzierungsmarkers  $\alpha$ MHC in den belasteten Versuchstiergruppen statt. Mittelwerte  $\pm$  SEM; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

#### **4.4.2.4 Die Zellverbindungen in den Glanzstreifen der Kardiomyozyten – Internalisation von Cx43**

Desmosomen zeichnen sich durch eine hohe Adhäsivität und eine damit verbundene hohe mechanische Widerstandsfähigkeit aus. Aufgrund dessen war im Folgenden die detaillierte Analyse der adhäsiven Zellverbindungen von besonderem Interesse. Um zu untersuchen ob es unter den Bedingungen der erhöhten Nachlast infolge der Aortenkonstriktion zu einer Dissoziation der Dsc2<sup>-/-</sup>-Desmosomen kam, wurde die Expression der desmosomalen Proteine an d28 mittels Western Blot und Immunfluoreszenz bestimmt. Wie im Ang II-Modell führte die chronische Druckbelastung zu keinem Integritätsverlust der Desmosomen Dsc2-defizienter Herzen. Die immunhistologischen Betrachtungen von Dsg2, Dsp, Pkp2 und PG verdeutlichten deren reguläre Lokalisation an den Glanzstreifen der Kardiomyozyten. Des Weiteren lagen keine Intensitätsunterschiede in den Fluoreszenzsignalen zwischen den Genotypen vor (Abb. 21). Die unveränderte Expression der desmosomalen Proteine ließ sich zusätzlich durch Western Blot-Analysen verifizieren, in denen sich eine gleiche Signalstärke von Dsg2, Dsp, Pkp2 und JUP in den Herzen beider TAC-operierter Versuchstiergruppen zeigte.

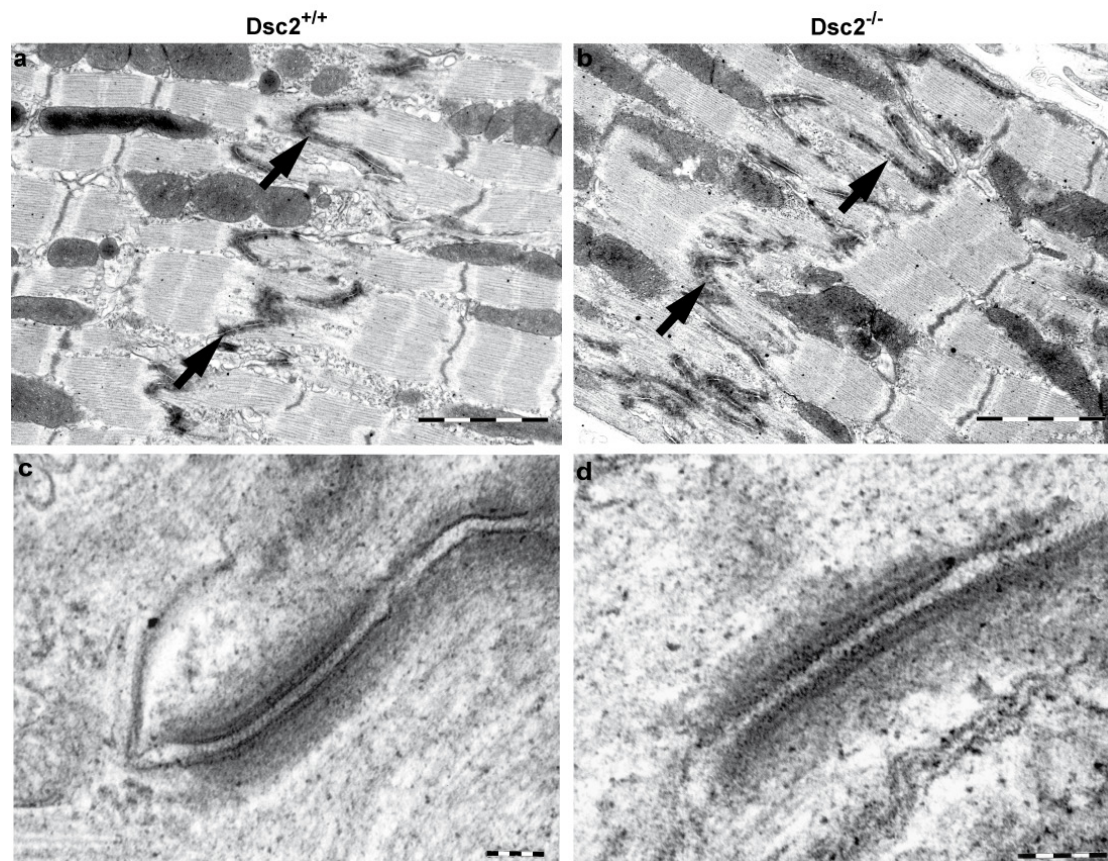




**Abb. 21: Molekulare Komposition kardialer Desmosomen in  $Dsc2^{-/-}$ -Mäusen nach TAC.** Die chronische Druckbelastung führte zu keiner veränderten Expression der desmosomalen Proteine. A) Immunfluoreszenzfärbungen kardialen Gewebes nach 28 Tagen TAC zeigten in beiden Genotypen die reguläre Lokalisation von Dsg2, Dsp, Pkp2 und PG an den Intercalated discs. Größenbalken: 25  $\mu$ m. B) Western Blots bestätigten ein vergleichbares Expressionsniveau der desmosomalen Proteine in  $Dsc2^{-/-}$  und  $Dsc2^{+/+}$ -Herzen.

Um ultrastrukturelle Veränderungen der Desmosomen ausschließen zu können, wurden ferner elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen angefertigt und hinsichtlich der Morphologie der Desmosomen, deren Anzahl, dem Erscheinungsbild der Intercalated discs und der Organisation des Zytoskeletts beurteilt. Im Vergleich der  $Dsc2^{-/-}$  mit  $Dsc2^{+/+}$ -Herzen ergaben sich diesbezüglich keine Auffälligkeiten (Abb. 22). Das Myokard der  $Dsc2^{-/-}$ -Tiere wies unveränderte Intercalated disc Komplexe auf, in denen Desmosomen im Wechsel mit den Adhärenzverbindungen auftraten. Die Desmosomen zeigten ihren typischen hochorganisierten Aufbau, bestehend aus einer dichten Mittellinie und zwei elektronendichten zytoplasmatischen

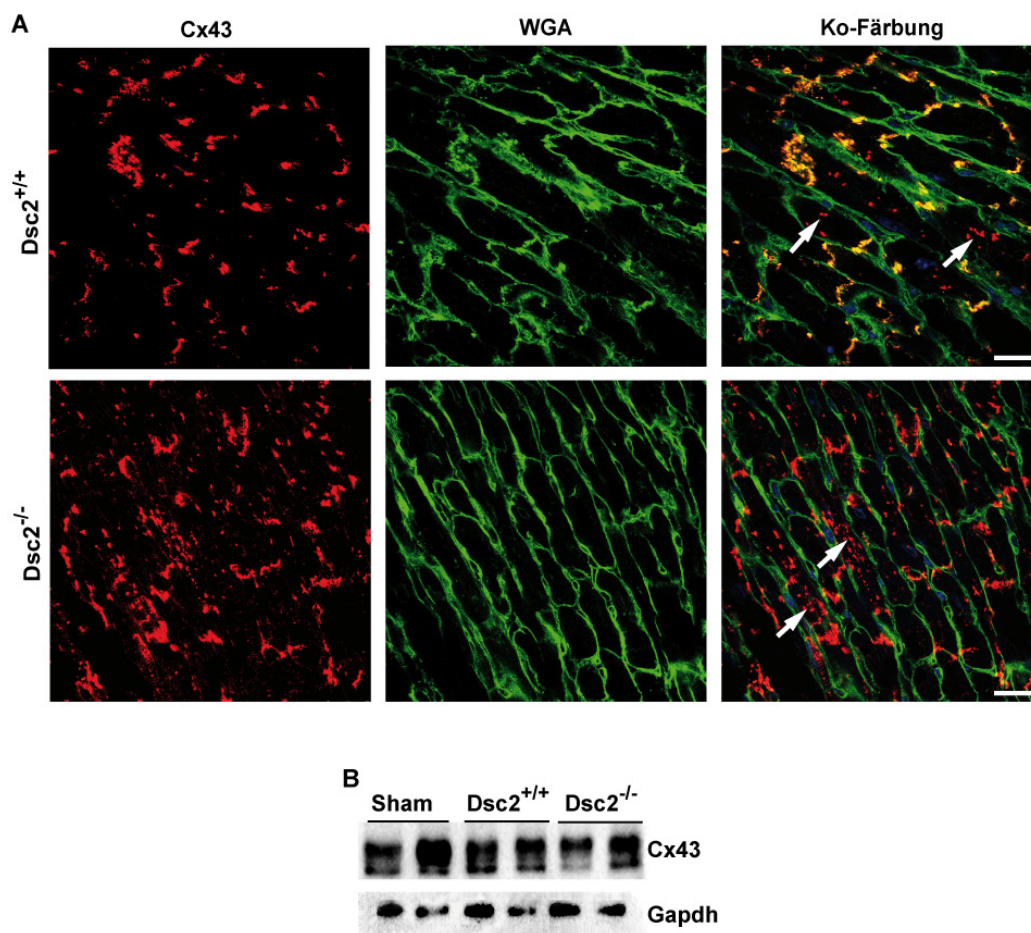
Plaques. Im Hinblick auf die Anbindung des Zytoskeletts ließen sich in den  $Dsc2^{-/-}$ -Herzen ebenfalls keine Veränderungen feststellen. Aktin- und Intermediärfilamente lagen in regulärer Anordnung vor und waren gleichförmig in Längsrichtung ausgerichtet.



**Abb. 22: Elektronenmikroskopische Analyse der Desmosomen und Intercalated discs.** TAC-operierte  $Dsc2^{-/-}$ -Herzen wiesen im Vergleich zu WT-Herzen keine ultrastrukturellen Veränderungen auf. a, b) Intercalated discs (schwarzer Pfeil) mit zahlreichen Desmosomen und Adhärenzverbindungen. Die Aktin- und Intermediärfilamente waren gleichmäßig ausgerichtet. c, d) Die Desmosomen beider Genotypen zeigten einen typischen, hochorganisierten Aufbau. Größenbalken: 2  $\mu$ m.

Wie bereits erwähnt, stellen die Intercalated discs ein einheitliches System der kardialen Zell-Zell-Verbindungen dar, in dem die Desmosomen, die Adhärenzverbindungen und die Gap junctions intermolekular und funktionell miteinander interagieren. Demzufolge sind entgegen dem Auftreten von anscheinend intakten Desmosomen Umbildungen in den anderen Zellkontakten denkbar. Hierzu durchgeführte Immunfluoreszenz-Analysen in TAC-operierten  $Dsc2^{-/-}$  und  $Dsc2^{+/+}$ -Herzen 28 Tage nach der OP, ergaben keine Expressionsunterschiede der

Adhärenzverbindungs-Proteine N-Cadherin und  $\beta$ -Catenin. In beiden Gruppen konnten gleich starke Fluoreszenzsignale an den Glanzstreifen detektiert werden. Die Analyse der Proteinexpression und -phosphorylierung von Cx43 mittels Western Blot ergab ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen. In den Dsc2<sup>-/-</sup>-Herzen, den WT und Schein-operierten Tieren war ein gleich starkes Signal für Cx43 auf gleicher Höhe zu detektieren, was für einen unveränderten Phosphorylierungsstatus spricht (Abb. 23B). Interessanterweise zeigte sich dagegen, wie bereits im Ang II Modell beobachtet, eine partielle Internalisation des membranständigen Connexin 43 (Abb. 23A). Infolge der Aortenkonstriktion erfolgte die Delokalisation des Gap junction-Proteins mit unterschiedlicher Ausprägung. Während im Dsc2-defizienten Myokardium großflächige zytoplasmatische Cx43-Ansammlungen im gesamten Querschnitt vorlagen, konnten in den Kardiomyozyten der Wildtypen nur vereinzelt positive intrazelluläre Färbungen beobachtet werden.



**Abb. 23: Delokalisation von Cx43 infolge von TAC.** A) Ko-Färbung von Cx43 (rot) mit dem Membranmarker wheat germ agglutinin (WGA, grün) auf Kryostatschnitten TAC-operierter Dsc2<sup>-/-</sup> und Dsc2<sup>+/+</sup>-Herzen an d28. Die erhöhte mechanische Belastung bewirkte eine partielle Internalisation von Cx43 (weißer Pfeil) in Dsc2-defizienten Herzen. In den Wildtypen ließen sich nur vereinzelt zytoplasmatische Cx43-Färbungen detektieren. Größenbalken: 25  $\mu$ m. B) Western Blot-Analyse von Cx43. Es zeigten sich keine Unterschiede in Proteinexpression und-phosphorylierung zwischen den Versuchstiergruppen.

#### 4.4.2.5 Aufrechterhaltung der zellulären Integrität Dsc2<sup>-/-</sup>-Kardiomyozyten unter chronischer Druckbelastung

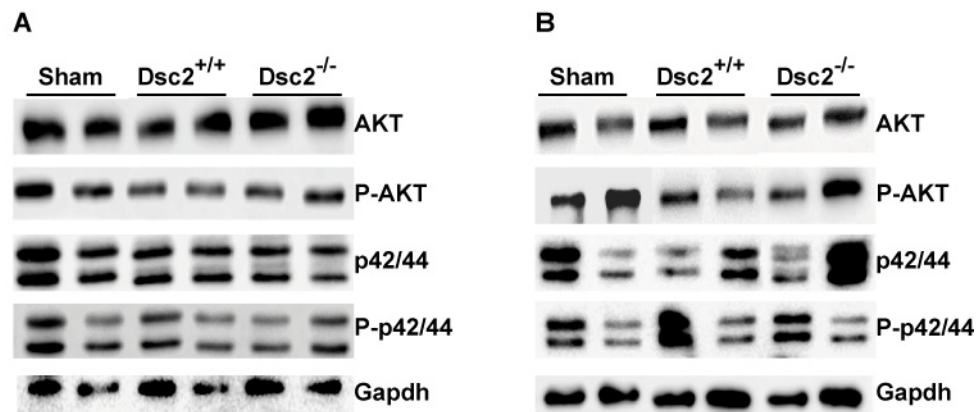
Man vermutet, dass die Desmosomen aufgrund ihrer hohen Adhäsivität eine primär stabilisierende Funktion ausüben und für einen starken mechanischen Zusammenhalt im Zellverband sorgen. In diesem Zusammenhang sollte neben ultrastrukturellen und molekularen Veränderungen in den Desmosomen, der Einfluss der chronischen Druckbelastung auf die zelluläre Stabilität untersucht werden. Analog zum Ang II-Modell wurde die Integrität der membranstabilisierenden Struktur DGC, sowie die Membranpermeabilität anhand von EBD bestimmt. Nach 28 Tagen TAC ließen sich



keine signifikanten Expressionsunterschiede des DGC detektieren. Immunfluoreszenzfärbungen transversaler Herzschnitte zeigten eine gleichmäßig positive Membranfärbung. Eine Abschwächung oder ein Verlust des DGC-Signals war in den Herzen stenosierter *Dsc2*<sup>-/-</sup>-Tiere nicht nachweisbar. In Übereinstimmung dazu konnten sowohl in den Knockouts als auch in den Wildtypen nur sporadisch EBD-positive Kardiomyozyten beobachtet werden, was für eine Aufrechterhaltung der sarkolemmalen Integrität spricht.

#### **4.4.2.6 Keine Veränderungen in Hypertrophie-assoziierten Signalwegen**

Infolge der chronischen Druckbelastung entwickelten die Knockout-Tiere im Vergleich zu den Wildtypen einen stärkeren pathologischen Phänotyp, der durch eine beeinträchtigte Herzfunktion, eine Dilatation des linken Ventrikels sowie eine erhöhte myokardiale Fibrosierung gekennzeichnet war. In diesem Zusammenhang sollten im Folgenden mögliche zugrunde liegende Signalwege untersucht werden. Zu den klassischen Hypertrophie-assoziierten Signalkaskaden gehören der MAPK-Signalweg und der PI3/AKT-Signalweg. Deren Schlüsselmoleküle p42/44 und AKT wurden mittels Western Blot-Analysen hinsichtlich der Expression der basalen und aktiven, phosphorylierten Formen charakterisiert. Anhand der durchgeführten Expressionsstudien ließ sich keine Aktivierung der analysierten Signaltransduktionsketten nachweisen. Sowohl an d14 als auch an d28 lag keine differentielle Proteinexpression oder -aktivierung zwischen den Versuchstiergruppen vor (Abb. 24). Die *Dsc2*<sup>-/-</sup>-Tiere, die Wildtypen und die Sham-Tiere wiesen zu beiden Versuchszeitpunkten gleich starke, positive Signale für AKT, P-AKT, p42/44, sowie P-p42/44 auf.



**Abb. 24: Einfluss von TAC auf den MAPK- und PI3/AKT-Signalweg.** Western Blot-Analysen von AKT und p42/44 an d14 (A) und d28 (B) zeigten keine Unterschiede in kardialer Proteinexpression und Proteinaktivierung (P-p42/44; P-AKT) zwischen Dsc2<sup>-/-</sup>, Dsc2<sup>+/+</sup> und Sham-Tieren.

## 5. Diskussion

Während der Morphogenese des Embryos, sowie im ausdifferenzierten Organismus ist die Zelladhäsion eine Grundvoraussetzung damit sich Organe ausbilden und den ständigen Belastungen wie Zug, Druck oder Dehnung standhalten können. Aufgrund ihrer hohen Adhäsivität wird insbesondere den Desmosomen bei der mechanischen Kopplung der Zellen eine essentielle Bedeutung zugeschrieben. Vor allem in stark beanspruchten Geweben wie der Epidermis oder dem Myokardium sorgen sie für die Aufrechterhaltung der zellulären Integrität und verleihen somit eine hohe strukturelle Stabilität. Ein Funktionsverlust der Desmosomen, hervorgerufen durch Mutationen in, oder Autoantikörpern gegen desmosomale Proteine, führt zu schweren humanen Herz- oder Hauterkrankungen. Innerhalb des Desmosoms nehmen die desmosomalen Cadherine des Desmocollin- und Desmoglein-Typs eine zentrale Rolle ein. Als transmembrane Komponenten stellen sie den adhäsiven Kontakt zwischen zwei benachbarten Zellen her und vermitteln gleichzeitig die Anbindung der zytoplasmatischen Plaque-Proteine Plakophilin, Plakoglobin und Desmoplakin. Die molekulare Interaktion der extrazellulären Domänen der desmosomalen Cadherine stellt einen Schlüsselaspekt bei der Ausbildung stabiler Zell-Zell-Kontakte dar. Bisherige Erkenntnisse ließen vermuten, dass die interzelluläre desmosomale Adhäsivität durch heterophile trans-Bindungen zwischen beiden Cadherin-Typen vermittelt wird. Ein genaues Modell konnte jedoch noch nicht definiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von Desmocollin 2 für die Etablierung und Aufrechterhaltung der strukturellen und funktionellen Gewebeintegrität während verschiedener Entwicklungsstadien untersucht. Hierfür sollte ein transgener Dsc2-defizienter Mausstamm generiert und charakterisiert werden. In den letzten Jahren sind zur Erforschung grundlegender aber auch klinischer Fragestellungen zahlreiche Mausmodelle etabliert worden. Gerade für kardiovaskuläre Aspekte sind Methoden wie Zell- oder Gewebekultur nur bedingt geeignet. Die physiologische bzw. pathologische Reaktion des Herzens auf mechanische Belastung ist ein komplexer und dynamischer Prozess, der durch unzählige unterschiedliche Signalketten und molekulare Mechanismen gesteuert wird. Alle relevanten hämodynamischen, humoralen sowie mechanischen Einflüsse können nur im intakten Herzen zum Tragen kommen, welches sich neben den Kardiomyozyten zu 45% aus Nicht-Myozyten zusammensetzt (Souders, 2009). Von

besonderer Bedeutung für die Zellkommunikation ist beispielsweise die dynamische Interaktion zwischen Kardiomyozyten, Fibroblasten und extrazellulärer Matrix (Banerjee, 2006). Da sich entsprechende Zusammenhänge bisher *in vitro* nicht simulieren lassen, wurde für die Bearbeitung der gesetzten Zielstellung eine konditionale Mauslinie etabliert. Das auf dem Cre/loxP-Rekombinationssystem basierende konditionale Modell bietet die Möglichkeit, neben einem klassischen einen induzierbaren und/oder organspezifischen Knockout zu generieren. Aufgrund der zeitlichen Rekombinationskontrolle ist das regulierbare System vor allem zur Untersuchung von Genen mit einem embryonal letalen Phänotyp der konstitutiven Knockout-Linie von Vorteil. Es konnte sowohl eine ubiquitäre als auch eine induzierbare, herzspezifische Knockout-Mauslinie für Dsc2 erfolgreich etabliert werden. Die Charakterisierung der ersteren war Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Die frühe Expression von Dsc2 ab dem 32-Zellstadium ließ eine grundlegende Bedeutung bereits während der pränatalen Entwicklung des Embryos vermuten. Des Weiteren konnte aufgrund der Tatsache, dass Dsc2 neben Dsg2 die einzige kardial exprimierte Isoform ist davon ausgegangen werden, dass es insbesondere im Herzen eine essentielle Funktion ausübt.

## **5.1 Desmocollin 2 ist nicht essentiell für die pränatale Entwicklung**

Die Bedeutung der desmosomalen Cadherine für die Embryonalentwicklung konnte bereits in Knockout-Studien von Dsc3 und Dsg2 belegt werden. Beide Knockout-Linien versterben zu einem frühen Entwicklungszeitpunkt um Embryonaltag E2.5 (Dsc3) (Den, 2006) bzw. E4.5 (Dsg2) (Eshkind, 2002). Während der Embryogenese sind reife Desmosomen erstmals ab E3.5 im Trophektoderm der Blastozyste zu detektieren, wo ihnen die Aufrechterhaltung der mechanischen Integrität gegenüber dem zunehmenden Druck des Blastocoels zugeschrieben wird (Fleming, 1991; Fleming, 1994). Die Letalität der Dsc3-defizienten Embryos vor dem Auftreten typischer Desmosomen bzw. das Vorhandensein eines intakten Trophektoderms in Dsg2<sup>-/-</sup>-Blastozysten sprechen für bisher ungeklärte Desmosom-unabhängige Funktionen der desmosomalen Cadherine. Im Gegensatz dazu konnten wir durch die Generierung einer Nullmutation im Dsc2-Gen in der Maus zeigen, dass der Verlust von Dsc2 keine pränatalen Entwicklungsdefekte hervorruft. Die Vermutung einer extra-desmosomalen Bedeutung während der frühembryonalen Morphogenese lässt



sich auf Dsc2 allein durch die Lebensfähigkeit der Knockout-Tiere nicht übertragen. Analog zu Dsg2 und Pkp2, ist Dsc2 unter physiologischen Bedingungen die einzige kardial exprimierte Isoform der Desmocolline. Daraus ergibt sich eine besondere Sensibilität des mutierten Herzens. Aufgrund dessen wurden detailliertere Untersuchungen zur pränatalen Funktion von Dsc2 an E13.5 Embryonen durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt ist die Entwicklung des funktionstüchtigen, vierkammrigen Vertebratenherzens vollständig abgeschlossen. Die Anfälligkeit des Herzmuskels gegenüber einer verminderten Adhäsivität in den Glanzstreifen der Kardiomyozyten wurde bereits durch die klassischen Knockout-Modelle der murinen Pkp2 und PG-Gene demonstriert. In beiden Knockout-Linien hatte die Nullmutation kardiale Veränderungen mit einer letalen Wirkung um E10.5 zur Folge (Grossmann, 2004; Bierkamp, 1996). Die Dsc2<sup>-/-</sup>-Embryonen hingegen zeigten keine Auffälligkeiten. Größe und allgemeine Morphologie waren unverändert. Kardiale Fehlbildungen konnten zudem ebenfalls nicht detektiert werden. Die von uns erhobenen Daten demonstrieren folglich, dass Desmocollin 2 nicht essentiell für die pränatale Entwicklung des Embryos sowie für die kardiale Morphogenese ist. Damit steht Dsc2 im Gegensatz zu den bisherigen klassischen KO-Modellen von Pkp2, PG, Dsp, Dsc3 und Dsg2, die durch eine embryonale Letalität gekennzeichnet sind (Bierkamp, 1996; Den, 2006; Eshkind, 2002; Grossmann, 2004; Gallicano, 1998).

## **5.2 Dsc2 ist nicht essentiell für die postnatale Entwicklung und die Desmosomenbildung**

Im Zusammenhang mit dem Ausbleiben gravierender morphogenetischer Defekte stellte sich die Frage nach möglichen pathologischen Veränderungen während späterer Entwicklungsstadien. Die Knockout-Studien von Dsc1 und Dsc3 ließen dabei das Auftreten von Haut- oder Schleimhautanomalien vermuten. Der Verlust von Dsc1 beispielsweise führte zu chronischer Dermatitis und Parakeratose, die Inaktivierung von Dsg3 hingegen zur Entstehung von eitriger Konjunktivitis und verkrusteten Hauterosionen (Koch, 1997; Chidgey, 2001).

Über einen Beobachtungszeitraum von einem Jahr zeigten die homozygoten Dsc2<sup>-/-</sup>-Tiere keine äußerlich sichtbaren Krankheitssymptome. Größe, Fertilität und Vitalität waren zu Wildtypen vergleichbar. Detailliertere Untersuchungen der Haut ergaben ebenfalls keine Auffälligkeiten. Die transgenen Tiere wiesen weder Hauterosionen,

Haarverlust, Blasenbildung oder Verkrustungen, noch mukosale Veränderungen auf. Der Verlust von Dsc2 scheint demzufolge keinen Einfluss auf die postnatale Entwicklung zu haben. In Anbetracht der pathologischen epidermalen Phänotypen Dsc1 und Dsg3-defizienter Tiere ist dies relativ überraschend. Bedenkt man jedoch, dass in der Haut zwei weitere Desmocolline exprimiert werden, liegt die Vermutung einer Funktionsübernahme von Dsc2 durch andere Isoformen nahe. Das Herz hingegen nimmt insofern eine Sonderstellung ein, als dass Dsc2 die einzige exprimierte Dsc-Isoform ist. Dennoch konnten auch in den adulten Tieren keine herzspezifischen Auswirkungen des Dsc2-Verlustes beobachtet werden. Echokardiographische und histologische Untersuchungen zur Funktion und Morphologie der Dsc2<sup>-/-</sup>-Herzen ergaben keine pathologischen Auffälligkeiten in Pumpfunktion und linksventrikulären Wanddicken. Die Unversehrtheit Desmosomen-exprimierender Gewebe verdeutlicht somit, dass die ubiquitäre Inaktivierung von Dsc2 offenbar nicht nur im Embryo, sondern auch während der postnatalen Entwicklung gut kompensiert werden kann. Aufgrund der Tatsache, dass Dsc2 als desmosomales Adhäsionsmolekül fungiert, war im Weiteren von einer morphologischen und/oder funktionellen Beeinträchtigung der Desmosomen auszugehen. Die zeitliche Korrelation zwischen der Dsc2-Synthese und dem Auftreten reifer Desmosomen im Trophektoderm der Blastozyste ließ eine grundlegende Bedeutung für die Desmosomenbildung annehmen. Die Expression der desmosomalen Proteine im frühen Embryo ist zeitlich reguliert, beginnend mit Plakoglobin im 8-Zellstadium, Desmoplakin im 16-Zellstadium, gefolgt von den desmosomalen Cadherinen im 32-Zellstadium (Fleming, 1991). Diesem temporalen Expressionsmuster wird eine Schlüsselfunktion bei der Desmosomenformation zugeschrieben. Das relativ späte Auftreten der Desmocolline und Desmogleine zum Zeitpunkt der Entstehung erster Desmosomen scheint dabei einer schnellen Anordnung und Membranbindung der zuvor synthetisierten Plaquekomponenten zu dienen (Fleming, 1991). Es existieren mehrere Hinweise, dass insbesondere die Desmocolline eine prädominante Rolle bei der Initiation des Zusammenbaus der Desmosomen, aber auch der Adhärenzverbindungen spielen. In MDCK-Zellen beispielsweise, konnte die Desmosomenbildung als ein 2-phasiger Prozess dargestellt werden. Unmittelbar nach Ca<sup>2+</sup>-Stimulation war Dsc2 in einem primären Schritt an der Zelloberfläche zu detektieren. Der Transport von Dsg2 zu den Zell-Zell-Kontakten hingegen erfolgte zusammen mit Plakoglobin, E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin

zeitlich verzögert als ein sekundärer Prozess (Burdett, 2002). In einer weiteren Studie wurde die unterschiedliche Bedeutung der Cadherine bezüglich der Ausbildung von Adhäsionsverbindungen durch dominant-negative Mutationen in Dsc3 und Dsg3 demonstriert. Während die Expression von N-terminal deletierten Dsg3 in HaCaT-Zellen lediglich die Formation von Desmosomen beeinträchtigte, hatte das mutierte Dsc3 zusätzlich einen inhibierenden Effekt auf die Adhärenzverbindungen. Der Nachweis der Interaktion von Desmocollin mit  $\beta$ -Catenin, ließ schließlich die Hypothese zu, dass Dsc an den Zellkontakten mit den Adhärenzverbindungen interagiert und so die nachfolgende Anordnung der Desmosomen initiiert (Hanakawa, 2000). Diese durch *in vitro* Experimente aufgestellte Theorie lässt sich *in vivo* nicht bestätigen. Die Herzen der Dsc2<sup>-/-</sup>-Tiere wiesen morphologisch klar definierte Desmosomen auf, deren ultrastrukturelles Erscheinungsbild durch eine typische Mittellinie und jeweils zwei elektronendichte, zytoplasmatische Plaques gekennzeichnet war. Es zeigte sich ebenfalls kein Einfluss der Dsc2-Inaktivierung auf die Expression oder Lokalisation anderer desmosomaler Proteine. Noch lag eine Veränderung der Adhärenzverbindungen vor. Innerhalb des Desmosoms übt das transmembrane Dsc-Molekül eine bivalente Funktion aus: zum einen vermittelt es die transzelluläre Interaktion zweier benachbarter Zellen und zum anderen dient es als Bindepartner für Plakophilin und Plakoglobin. Daher wäre ein Auseinanderdriften der Halbdesmosomen und eine damit verbundene Aufweitung des Interzellularspaltes, sowie eine Dissoziation der Plaques denkbar gewesen. Demzufolge entspricht das Auftreten morphologisch intakter Desmosomen in den Dsc2<sup>-/-</sup>-Herzen nicht der gängigen Lehrmeinung. Des Weiteren demonstriert dies entgegen der Erwartung, dass Dsc2 für die Etablierung kardialer Desmosomen unter basalen Bedingungen nicht essentiell ist. Weiterführende Studien sollen Aufschluss darüber geben, inwieweit sich die Erkenntnisse auf andere Organe wie die Haut übertragen lassen.

In Korrelation zum Knockout von Dsc2, gehen die hautpathologischen Phänotypen der Dsc1<sup>-/-</sup> und Dsg3<sup>-/-</sup>-Tiere ohne strukturelle Veränderungen in den Desmosomen einher. In ähnlicher Weise beeinträchtigte der Knockout von Plakophilin 2 in der Maus zwar die Bildung kardialer Desmosomen, in ein- und mehrschichtigen Epithelien hingegen schienen die desmosomalen Zellverbindungskomplexe völlig unbeeinflusst (Grossmann, 2004). Basierend auf der Expression mehrerer Isoformen in der Haut kann in allen drei Studien, sowie im KO-Modell von Dsc2, eine Kompensation des jeweiligen Proteins vermutet werden. Ein struktureller und

funktioneller Ausgleich des Dsc2-Verlustes ist jedoch auch durch verwandte Strukturproteine wie die klassischen Cadherine denkbar. Beide Cadherin-Typen weisen neben vier hochkonservierten gemeinsamen EC-Motiven eine 50%ige Sequenzhomologie auf. Dabei sind die Desmocolline stärker mit den klassischen Cadherinen verwandt als die Desmogleine (Huber, 2003; Syed, 2002). Solch ein Mechanismus kommt vor allem auch für das Herz in Frage, wo Dsc2 die prädominante Dsc-Isoform darstellt. In diesem Zusammenhang könnte eine verstärkte Expression von N- oder E-Cadherin bzw. Dsc1/3 die Ausbildung heterophiler trans-Bindungen ermöglichen. Eine Kompensation durch Dsg2 hingegen würde für die Etablierung homophiler, isoformspezifischer Cadherin-Dimere in den Dsc2<sup>-/-</sup>-Desmosomen sprechen. Anhand der durchgeführten Expressionsstudien konnten jedoch weder im Herzen noch in der Haut der Dsc2<sup>-/-</sup>-Tiere Veränderungen in mRNA- und/oder Proteinlevel von Dsg2, N-Cadherin, Dsc1, Dsc3 oder E-Cadherin festgestellt werden. Eine Überexpression der Cadherine scheint demzufolge nicht für das Fehlen von Dsc2 zu kompensieren. Vergleichbare Ergebnisse wurden ebenfalls in den Dsc1 und Dsg3-defizienten Tieren erhoben (Den, 2006; Koch, 1997). Dennoch ist eine Kompensation durch die untersuchten Proteine nicht ausgeschlossen. Insbesondere in den Hybridstrukturen der Intercalated discs könnte eine Umverteilung der Cadherine einen Funktionsausgleich von Dsc2 bewirken. Entsprechende Lokalisationsstudien wie die Immunelektronenmikroskopie werden Bestandteil weiterführender Analysen sein.

### **5.3 Die mutmaßlich verminderte Adhäsivität Dsc2-defizienter Desmosomen**

Desmosomen unterscheiden sich von anderen Adhäsionsverbindungen durch ihre extrem hohe Festigkeit. Demzufolge sind sie vor allem in stark beanspruchten Geweben wie der Haut oder dem Myokardium für die Aufrechterhaltung der zellulären und mechanischen Integrität von essentieller Bedeutung. Die desmosomalen Cadherine nehmen als transmembrane Proteine des Desmosoms eine Schlüsselrolle bei der Ausbildung des Interzellularkontaktes ein, indem sie über ihre extrazellulären Domänen lateral und transzellulär miteinander interagieren. Dabei wird davon ausgegangen, dass die hohe interzelluläre Adhäsivität der Desmosomen durch heterophile trans-Dimere zwischen den Desmocollinen und Desmogleinen

vermittelt wird. Konkrete Beweise für die Bedeutung der Ko-Expression beider Cadherine für die adhäsive Funktion wurden bisher ausschließlich *in vitro* durch Transfektionsstudien in Zellkultursystemen oder Experimente mit rekombinanten Proteinen erbracht (Chitaev, 1997; Marcozzi, 1998; Syed, 2002). Interessanterweise hatte in der vorliegenden Arbeit der Verlust von Dsc2 im Mausmodell keinen schwerwiegenden Effekt auf die desmosomale Integrität. Dies zeigte sich durch das Vorhandensein morphologisch intakter Desmosomen sowie durch das Ausbleiben struktureller Veränderungen Desmosomen-exprimierender Gewebe. Die Funktion von Dsc2 als desmosomales Adhäsionsmolekül ließ jedoch eine beeinträchtigte Stabilität der Dsc2<sup>-/-</sup>-Desmosomen vermuten. Unter der Annahme einer daraus resultierenden verminderten mechanischen Widerstandskraft wurden die transgenen Tiere erhöhten Belastungsbedingungen ausgesetzt. Sowohl die Infusion von Angiotensin II als auch das thorakale Aortenbanding sind etablierte Methoden zur Induktion einer kardialen Hypertrophie. Dabei bietet letzteres zusätzlich den Vorteil eventuelle metabolische Nebenwirkungen des Hormons Ang II, wie die Stimulation von apoptotischen, inflammatorischen und fibrotischen Prozessen, zu umgehen. Nach 14 Tagen Ang II-Gabe entwickelten die Dsc2<sup>-/-</sup>-Tiere einen pathologischen Herzphänotyp, der durch eine erhöhte myokardiale Fibrose, einer Aktivierung von Hypertrophiemarkern sowie eine beeinträchtigte linksventrikuläre Leistung gekennzeichnet war. Eine vergleichbare hypertrophe Belastungsreaktion konnte nach 2 bzw. 4-wöchiger Aortenkonstriktion mit einer markanteren Ausprägung reproduziert werden. Dagegen ließ sich auch unter den Bedingungen der erhöhten Nachlast kein direkter Nachweis für einen Stabilitätsverlust der Desmosomen erbringen. Dies korrelierte mit der Analyse des DGC, welche die Aufrechterhaltung der zellulären Integrität Dsc2<sup>-/-</sup>-Kardiomyozyten belegte. Da eine erhöhte Expression der Cadherine als kompensatorischer Mechanismus ausgeschlossen werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass insbesondere im Herzen die Ausbildung der Desmosomen auf homophilen trans-Bindungen des Dsg2-Moleküls basiert. Damit stellen die Ergebnisse des Dsc2-Knockouts das bisherige Modell der Cadherin-Interaktion in Frage. Die Theorie der homophilen, isoformspezifischen trans-Dimerisierung wird durch neueste *in vitro*-Experimente gestützt. Mittels extrazellulären, homobifunktionalen Crosslinkings wurde eine entsprechende Assoziation für Dsc2, Dsc3, Dsg3 und Dsg2 in HaCaT-Zellen aufgezeigt (Nie, 2011). Die vorliegenden Ergebnisse stellen jedoch keinen direkten *in vivo*-Nachweis dar. Um einen 3-dimensionalen Eindruck der Cadherin-

Schnittstelle in Dsc2<sup>-/-</sup>-Desmosomen zu erhalten, sind hierfür beispielsweise kryoelektronentomographische Untersuchungen denkbar. Besonders interessant wäre die Analyse eines Dsc2-Dsg2-Doppelknockout-Modells. Da die frühe embryonale Letalität der klassischen Dsg2-KO-Mäuse auf eine Desmosomen-unabhängige Funktion zurückgeführt wird (Eshkind, 2002), ist zur Analyse der desmosomalen Adhäsivität die Anwendung eines temporal verzögerten bzw. gewebespezifischen Rekombinationssystems notwendig. Entsprechend geeignete Treibermäuse sind u.a. der  $\alpha$ MHC-Cre und der MerCreMer-Mausstamm. Diese ermöglichen eine herzspezifische Inaktivierung der Zielgene während der mittleren Embryonalentwicklung bzw. im adulten Stadium. Beide kardiale Dsc2-Dsg2-KO-Linien werden derzeit in unserer Arbeitsgruppe generiert. Erste Verpaarungen doppelt-heterozygoter  $\alpha$ MHC-Cre-Tiere ergaben bisher keine homozygot deletierten Nachkommen. Die mutmaßliche Letalität der Doppel-Knockouts würde für eine relevante Bedeutung der isoformspezifischen trans-Bindung sprechen. Bedenkt man jedoch die besondere Rolle der Desmosomen für die Aufrechterhaltung der mechanischen Integrität, stellt sich vor allem im adulten Organismus die Frage nach der Funktionalität der homophilen Cadherin-Dimere. In den Dsc2<sup>-/-</sup>-Tieren war sowohl auf molekularer oder zellulärer, als auch auf Organebene kein Integritätsverlust festzustellen. Dennoch lässt sich anhand des Abfalls der linksventrikulären Leistung unter Belastungsbedingungen eine verminderte desmosomale Adhäsivität vermuten. Nach dem Modell der desmosomalen Hyperadhäsivität sind in hochadhäsiven Desmosomen die extrazellulären Domänen der Cadherine lateral und transzellulär miteinander verbunden. Im weniger adhäsiven Zustand bilden sich jedoch ausschließlich transzelluläre Dimere aus (Garrod, 2008). Im Zusammenhang mit der Hypothese einer erhöhten trans-Interaktion der Dsg2-Moleküle in Dsc2-defizienten Desmosomen, könnte somit eine fehlende oder verminderte cis-Orientierung die veränderten adhäsiven Eigenschaften erklären. Zusätzlich konnte für isoformspezifische Interaktionen im Vergleich zu heterophilen eine deutlich geringere Affinität demonstriert werden (Amagai, 1997). Zusammenfassend ergibt sich daraus folgende Theorie: Infolge des Dsc2-Verlustes gehen die Dsg2-Moleküle zweier benachbarter Zellen verstärkt homophile Bindungen ein. Die offenbar intakten Desmosomen können unter basalen Bedingungen die strukturelle und funktionelle Integrität aufrechterhalten. Sie sind aber aufgrund der schwächeren Assoziation der homophilen trans-Dimere bei gleichzeitiger Reduktion

der lateralen Interaktionen belastungsempfindlicher. Somit führt die erhöhte mechanische Beanspruchung im Ang II und TAC-Modell zur Lockerung des Zellverbandes, sodass über bisher ungeklärte Mechanismen eine korrekte elektrische Erregungsleitung nicht mehr gewährleistet ist.

#### **5.4 Dsc2 ist für die Aufrechterhaltung der kardialen Funktion unter Belastungsbedingungen essentiell**

In beiden Belastungsmodellen war der schnelle Funktionsverlust der Dsc2-defizienten Herzen besonders auffällig. Zwei mögliche Mechanismen kommen zur Erklärung der kardialen Dysfunktion in Frage. Wie bereits diskutiert ließen sich weder nach Ang II-Gabe noch nach Aortenbanding molekulare oder ultrastrukturelle Veränderungen der Desmosomen detektieren. Dennoch ist von einer verminderten desmosomalen Adhäsivität infolge des Dsc2-Verlustes auszugehen. Die daraus resultierende verminderte mechanische Widerstandsfähigkeit führt unter den Bedingungen der erhöhten Belastung zur Lockerung des Zellverbandes, sodass die korrekte elektrische Kopplung der Kardiomyozyten über beispielsweise Gap junctions, Na<sup>+</sup>-Kanäle und K<sup>+</sup>-Kanäle nicht mehr aufrechterhalten werden kann. Eine direkte elektrische Isolation der Kardiomyozyten hingegen, durch die fibrotischen Veränderungen ist relativ unwahrscheinlich. Der beobachtete Funktionsverlust stand in keinem Verhältnis zum Grad der Fibrosierung. Zudem konnte kein erhöhter Zelluntergang durch Apoptose detektiert werden. Die zweite Theorie basiert auf der zunehmenden Beschreibung eines bestehenden intermolekularen Netzwerkes zwischen den Adhäsionsverbindungen, den Gap junctions und den Ionenkanalkomplexen an den Glanzstreifen der Kardiomyozyten. Demnach wirken sich geringfügige morphologische Veränderungen der desmosomalen Zellkontakte direkt auf die elektrischen Verbindungen aus (Rizzo, 2012; Sato, 2009; Sato, 2011). Während die Desmosomen und die Adhärenzverbindungen strukturell unbeeinflusst waren, fand im Zuge der erhöhten Nachlast eine partielle Internalisation von Cx43 statt. Da die Funktion von Cx43 und dessen Regulation sehr komplex ist, ist eine genaue Definition der beobachteten Veränderungen schwierig. Zwar wurde in ARVC-Patienten mit Mutationen in PKP2, DSC2 bzw. DSG2 ein verändertes Cx43-Signal nachgewiesen, in Mäusen jedoch wurde eine heterozygote Cx43-Deletion gut toleriert und war erst ab einer Proteinreduktion um 90% mit einer kardialen Dysfunktion

verbunden (Fidler, 2008; Gehmlich & Lambiase, 2011; Gehmlich, 2012; Stein, 2011). Im vorliegenden Mausmodell war eine erhöhte zytoplasmatische Lokalisation von Cx43 zu beobachten. *In vitro* Studien in COS-1 Zellen demonstrierten bereits eine direkte Interaktion zwischen Dsc2 und Cx43 (Gehmlich, Lambiase, 2011). In diesem Zusammenhang liegt die Vermutung nahe, dass eine verminderte Bindung zwischen Cx43 und Dsc2 eine Dissoziation der Connexone bewirkt. Demnach wäre die kardiale Dysfunktion der Dsc2<sup>-/-</sup>-Tiere die direkte Folge einer veränderten Erregungsleitung über die Gap junction-Komplexe. Dennoch ist die Aussage die Internalisation von Cx43 als primären, pathologischen Effekt zu betrachten recht spekulativ. Die Dsc2<sup>-/-</sup>-Kardiomyozyten wiesen zwar zytoplasmatische Cx43-Ansammlungen, jedoch bei einem gleichzeitig unveränderten Signal an den Intercalated discs auf. Zudem zeigten sich keine Unterschiede in Proteinexpression oder dem Phosphorylierungsstatus. Dieses lässt vermuten, dass die Funktion der Gap junctions nicht oder nur geringfügig beeinträchtigt ist. Weitere Untersuchungen wie Immunelektronenmikroskopie müssten die subzelluläre Lokalisation des zytoplasmatischen Cx43-Pools klären. Die genaue Definition des zellulären Kompartimentes könnte Aufschluss darüber geben, ob es sich bei dem internalisierten Cx43 um Vorstufen oder Abbauprodukte handelt. Des Weiteren zeigt mitochondriales Cx43 als Trigger für die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) eine kardioprotektive Funktion (Boengler, 2006). In diesem Fall wäre bezüglich des zytoplasmatischen Cx43 von einem sekundären, durch kardiales Remodeling entstanden Effekt auszugehen.

## **5.5 Das Dsc2-Knockout-Modell im Vergleich zu anderen Tiermodellen desmosomaler Proteine**

Desmosomen sind hochadhäsive Zellverbindungen, die für einen starken strukturellen Zusammenhalt der Zellen im Zellverband sorgen. Bereits im Embryo sind sie für die Etablierung der Gewebeintegrität von essentieller Bedeutung. Dies zeigt sich in den klassischen Knockout-Mausmodellen der kardial exprimierten desmosomalen Proteine Dsp, Pkp2 und PG, die frühembryonal letal sind. Der Knockout von Pkp2 und PG führt infolge von Herzdefekten zu einer Letalität um E10.5 (Bierkamp, 1996; Grossmann, 2004). Dsp-defiziente Tiere hingegen versterben bereits im Blastozysten-Stadium um E6.5 (Gallicano, 1998). Aufgrund der letalen Phänotypen sind diese Modelle zur Erforschung der desmosomalen Funktion in postnatalen Stadien



ungeeignet. Heterozygote Knockout-Modelle, sowie transgene Mäuse mit einer konditionalen, gewebespezifischen Geninaktivierung oder mit dominant-negativen Mutationen entwickeln pathologische Veränderungen in Herz und Haut, die häufig humanen Erkrankungen entsprechen. Mäuse mit einer veränderten Expression kardialer desmosomaler Proteine weisen häufig Merkmale von Kardiomyopathien auf. Die herzspezifische Inaktivierung von PG beispielsweise, führt zu einem Verlust der Kardiomyozyten durch Apoptose, zu erhöhten inflammatorischen Infiltrationen und einer zunehmenden myokardialen Fibrosierung. Des Weiteren konnten eine Dilatation des linken Ventrikels und eine beeinträchtigte Pumpfunktion nachgewiesen werden (Li, 2011). In ähnlicher Weise hatte die herzspezifische Überexpression einer ARVC-assoziierten Mutation in *Dsg2* den plötzlichen Herztod, hervorgerufen durch spontane Arrhythmien, kardiale Dysfunktion, biventrikuläre Dilation und nekrotische sowie fibrotische myokardiale Veränderungen zur Folge (Pilichou, 2009). Dem gegenüber steht die in der vorliegenden Arbeit untersuchte *Dsc2*-defiziente Mauslinie. *Dsc2*<sup>-/-</sup>-Tiere waren lebensfähig und zeigten auch im Embryonalstadium keine pathologischen Auffälligkeiten. Anders als *Dsp*, *PG*, *Pkp2* aber auch *Dsg2*, scheint *Dsc2* somit nicht essentiell für die pränatale Entwicklung zu sein. Auch im adulten Tier sind hinsichtlich kardialer Veränderungen keine Gemeinsamkeiten zu erkennen. Unter basalen Bedingungen wiesen die *Dsc2*<sup>-/-</sup>-Herzen weder eine erhöhte Apoptose, Fibrose oder Inflammation, noch funktionelle Beeinträchtigungen auf. Dennoch konnte eine herzspezifische Bedeutung von *Dsc2* aufgezeigt werden. Die Reduktion der linksventrikulären Leistung nach Ang II-Gabe und Aortenbanding wies auf eine primär stabilisierende Funktion von *Dsc2* bei erhöhter mechanischer Belastung hin. Interessanterweise lassen sich hier, wie auch in anderen Mausmodellen, Parallelen zur ARVC ziehen. In ARVC-Patienten treten die Arrhythmien überwiegend während oder kurz nach sportlicher Aktivität auf, weshalb die ARVC häufig bei Sportlern die Ursache für plötzliche Herztodesfälle ist. In ähnlicher Weise zeigte sich ein Zusammenhang zwischen körperlicher Beanspruchung und kardialer Funktion in heterozygoten *PG*-defizienten Mäusen. In diesen führte Ausdauertraining zu einer verstärkten rechtsventrikulären Dysfunktion und zum gehäuftem Auftreten spontaner Arrhythmien (Kirchhof, 2006). Beide Modelle stützen die Theorie, dass eine verminderte desmosomale Adhäsivität und eine damit verbundene erhöhte Anfälligkeit gegenüber mechanischer Belastung zur Pathogenese der ARVC beiträgt.

Im Gegensatz zur Inaktivierung von Dsc2 in der Maus, hatte der Morpholino-Knockdown in Zebrafisch-Embryonen gravierende Effekte auf die Morphogenese und Funktion des Herzens. Obwohl jeweils eine besondere Rolle von Dsc2 im Herzen herausgestellt werden konnte, sind hinsichtlich der Ausprägung des pathologischen Phänotyps starke Unterschiede zu erkennen. Dabei war die verminderte Expression von Dsc2 im Zebrafisch mit einer beeinträchtigten Kontraktilität, Bradykardien sowie einem Verlust der desmosomalen Mittellinie und einer Reduktion des intrazellulären Plaques assoziiert (Heuser, 2006). Beide Tierklassen lassen sich aufgrund ihrer evolutionären Verschiedenheit nur geringfügig miteinander vergleichen. Die Unterschiede zum Mausmodell könnten auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass Zebrafische nur ein Desmocollin und zwei Desmogleine besitzen (Goonasinghe, 2012). Daher kann der Verlust von Dsc2 offenbar weniger gut kompensiert werden als in Mammalia. Aufgrund der strukturellen Veränderungen in den Desmosomen der Dsc2<sup>-/-</sup>-Zebrafische, ist die Ausbildung homophiler Dsg-Dimere in diesem Fall ebenfalls unwahrscheinlich. Isoformspezifische trans-Bindungen zwischen den desmosomalen Cadherinen könnten somit eine Spezialisierung der Mammalia darstellen.

## 5.6 Die Rolle von Dsc2 in Signalwegen

Dsc2 zeigte sich für die Aufrechterhaltung der kardialen Belastungsresistenz von essentieller Bedeutung. Da die desmosomalen Cadherine nicht nur als rein mechanische Bindemoleküle anzusehen sind, konnte in diesem Zusammenhang eine weitere, adhäsionsunabhängige Funktion von Dsc2 nicht ausgeschlossen werden. Nachgewiesenermaßen erfüllen die desmosomalen Glykoproteine auch wichtige regulatorische Aufgaben in Proliferations- und Differenzierungsprozessen. Aufgrund dessen wurden bezüglich der pathologischen Herzveränderungen belasteter Dsc2<sup>-/-</sup>-Tiere eine mögliche Beteiligung von Signaltransduktionswegen untersucht. Mehrere Signalkaskaden sind bei der Entstehung einer Herzinsuffizienz involviert. Alle führen zur Aktivierung von zellulären und morphologischen Anpassungsmechanismen, die im Resultat eine Zunahme der kontraktilen Einheiten und eine Reduktion des ventrikulären Wandstress bewirken (Ruwhof, 2000). Ist dieser Adaptationsprozess mit der Zeit unzureichend, entwickelt sich ein pathologischer Phänotyp bis hin zur Herzinsuffizienz. Bei der durch mechanische Belastung induzierten Hypertrophie sind

zwei Hauptsignalwege beschrieben worden: Der Mitogen-activated protein kinase (MAPK)-Signalweg und der Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT (PI3/AKT)-Signalweg. Innerhalb dieser komplexen Signalkaskaden sind p38, p42/44 (ERK1/2), und AKT sogenannte Schlüsselmoleküle. Eine Funktion der MAP-Kinasen p38 und p42/44 als hypertrophe Mediatoren konnte beispielsweise in transgenen Überexpressions- oder Belastungsmodellen in der Maus demonstriert werden. Die Aktivierung der MAPK-Kaskaden stand dabei in einem direkten Zusammenhang mit myokardialer Fibrosierung, der Entwicklung von kardialer Dysfunktion und der pathologischen Größenzunahme des Herzens (Liao, et al., 2001; Zong, 2012). Die Rolle von AKT bei der Entstehung der kardialen Hypertrophie hingegen wurde u.a. in Mausmodellen zur Untersuchung der ARVC herausgestellt. Der durch die herzspezifische Inaktivierung des Armadilloproteins PG induzierte ARVC-ähnliche Phänotyp korrelierte mit der Aktivierung der AKT - GSK3 $\beta$  -  $\beta$ -Catenin-Kaskade. (Li, 2011). In den Dsc2<sup>-/-</sup>-Mäusen ließ sich die belastungsbedingte hypertrophe Reaktion nicht auf eine veränderte Signaltransduktion zurückführen. Proteinexpression und Phosphorylierungsstatus von p38, p42/44 und AKT waren sowohl nach Ang II-Gabe als auch nach TAC unverändert. Somit konnte in dieser Arbeit keine Signalfunktion für Dsc2 nachgewiesen werden. Dem gegenüber stehen die Zellkulturanalysen von Kolegraff *et al.*, in denen der Knockdown von Dsc2 zu einer Aktivierung des  $\beta$ -Catenin/AKT-Signalweges führte (Kolegraff, 2011). Des Weiteren demonstrierten Studien zum *Pemphigus vulgaris* Antigen Dsg3 einen Effekt der Autoantikörper auf p38 und das nachgeschaltete Signalmolekül HSP27. Somit wäre eine Beteiligung dieses Signalweges ebenfalls denkbar gewesen (Berkowitz, 2005; Berkowitz, 2006). Der fehlende Nachweis einer veränderten Signalgebung in den belasteten Dsc2<sup>-/-</sup>-Tieren ist ein Indiz, dass die kardiale Dysfunktion die direkte Folge einer verminderten desmosomalen Adhäsivität sein könnte. Da die Signaltransduktionsketten jedoch umfassende und vielfältige Netzwerke darstellen, kann eine Involvierung bei der Pathogenese der Dsc2<sup>-/-</sup>-Herzen nicht ausgeschlossen werden. Experimente wie Microarray- und Proteomanalysen könnten darüber Aufschluss geben.

Zusammenfassend gibt die vorliegende Arbeit zum ersten Mal Einblicke in die Funktion von Desmocollin 2 *in vivo*. Durch die Analyse eines klassischen Knockout-Mausmodells unter basalen als auch unter Belastungsbedingungen konnten wir zeigen, dass Dsc2 entgegen der Lehrmeinung nicht essentiell für die Etablierung und

Aufrechterhaltung strukturell intakter Desmosomen ist. Die Ergebnisse der Belastungsexperimente sprechen jedoch für eine mutmaßlich verminderte desmosomale Adhäsivität in den Dsc2<sup>-/-</sup>-Tieren, wobei kein direkter morphologischer Beweis erbracht werden konnte. Hierfür müssten weiterführende Analysen Aufschluss über die genaue molekulare Struktur und Komposition der adhäsiven Schnittstelle der Dsc2-defizienten Desmosomen geben.

## 6. Material und Methoden

### 6.1 Material

Alle, in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien sind von folgenden Firmen bezogen worden: BioRad (München), Roth GmbH (Karlsruhe), Applied Biosystem (Darmstadt), Fermentas (St. Leon-Roth), Biozym Scientific GmbH, (Hessisch Oldendorf), Becton Dickinson (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (München), Invitrogen (Karlsruhe), Sakura (Staufen), Serva (Heidelberg).

#### 6.1.1 Enzyme

Alle Enzyme wurden nach Herstellerangaben und ggf. im mitgelieferten Puffer verwendet.

Enzym	Firma
DNaseI	Qiagen (Hilden)
KOD-Polymerase	Novagen (Darmstadt)
Proteinase K	Roth GmbH (Karlsruhe)
Restriktionsenzyme	NEB (Frankfurt)
Reverse Transkriptase, M-MuLV	NEB (Frankfurt)
T4-DNA-Ligase	NEB (Frankfurt)
Taq-DNA-Polymerase	Qiagen (Hilden)
Taq-DNA-Polymerase	New England Biolabs (NEB, Frankfurt)

#### 6.1.2 Plasmide

Plasmid	Referenz
pAEF	Ein Geschenk von M. Ohtsuka
PI451	Liu <i>et al.</i> , 2003
PI452	Liu <i>et al.</i> , 2003

#### 6.1.3 BAC-Klone

Bezeichnung	Vektor	Firma
RP23-38O14	pBACe3.6	RZPD (Berlin)

#### 6.1.4 Bakterienstämme

Bakterienstamm, <i>E. coli</i>	Genotyp	Referenz
DH10B	mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\Delta$ lacX74 deoR endA1 araD139 $\Delta$ (ara,	RZPD (Berlin)

	leu) 7697 rpsL recA1 upG $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 galU galK	
DY380	DH10B [ $\lambda$ 1857 (cro-bioA) $\phi$ Tet] galK <sup>+</sup> gal490	Ein Geschenk von D.L. Court
SW105	DY380 (cro-BioA) $\phi$ araC-PBAD Flpe gal <sup>+</sup> $\Delta$ galK	Ein Geschenk von D.L. Court
SW106	DY380 (cro-BioA) $\phi$ araC-PBAD Cre gal <sup>+</sup> $\Delta$ galK	Ein Geschenk von D.L. Court
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 deoR rec A1 endA1 hsdR17(rk <sup>-</sup> , mk <sup>+</sup> ) phoA, supE44 $\lambda$ <sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1	Stratagene (Böblingen)

### 6.1.5 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Medium	Referenz
E14.1	Mus musculus 129/Ola; ES-Zellen	DMEM (Gibco) + 15% FKS + 100 $\mu$ g/ml Streptomycin + 100 $\mu$ g/ml Penicillin + 1% nicht-essentielle Aminosäuren + 100 $\mu$ M $\beta$ -Mercaptoethanol + 500 U/ml LIF	Transgenic core facility

### 6.1.6 Oligonukleotide

Bis auf die Real-time Primer, stammen alle verwendeten Oligonukleotide von der Firma Biotez (Berlin) und wurden mit Hilfe des Online-Programms Primer3 designed. Die lyophilisierten Primer wurden in H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> in einer Konzentration von 100  $\mu$ M gelöst.

#### 6.1.6.1 Genotypisierungsprimer

Primer	Sequenz in 5'-3'-Richtung
Dsc2 del/flox F	CCCTCCCAGTCAGTGAAGTTA
Dsc2 del/flox R	TTTGATACCCAGCACACCTTT
Flp F	CTAATGTTGTGGGAAATTGGAGC
Flp R	CTCGAGGATAACTTGTTTATTGC
Cre F	GAACGCACTGATTTTCGACCA
Cre R	AACCAGCGTTTTTCGTTCTGC

#### 6.1.6.2 Primer für Klonierungs-PCR

Primer	Sequenz in 5'-3'-Richtung
<b>Recombineering-Arme</b>	
Dsc2 5' Arm O-S F	GCGGCCTCGGAGGCCACGCACAATGTCTACAGATGTCTT
Dsc2 5' Arm O-S R	GCGGCCAACCCGGCCCCAGAAGTGATAACAGAAGGCAATG
Dsc2 3' Arm O-S F	GCGGCCACTTAGGCCGAGTGAATTAAGAGACATGGAGCA

Dsc2 3' Arm O-S R	GCGGCCCTTACGGCCGCTTATTGCCAAGCACTGTAGTAA
<b>LoxP-sites</b>	
Dsc2 3' loxP F	TTATTTATTGAAAAATATGATTACCCAAAGAAGATAAAAAG ATGAAGTGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTC AGGTCTGAAGAGGAGTTT
Dsc2 3' loxP R	TATATCCATGGAATATAAATATCAAAAACCTATGTTATTATT GATTAACATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT ATTATGTACCTGACTG
Dsc2 5' loxP F	ATAAAAACAGTCCTAAGAAAGAATGTGGTTCCTGAGTAG GAAGATCTATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTA TCGACCTGCAGCCTGTTGA
Dsc2 5' loxP R	GAAAAGGCCAAGCACTCCCAAGACTCCCTTCTTTCCAATGC ACTTACTATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT GTCGAGGCTGATCAGCGA
<b>Southern-Sonde</b>	
Dsc2 3' ext. Sonde F	TCTGAGAGATGGCAACGTGAGG
Dsc2 3' ext. Sonde R	CTTACCGTAGTGCGAGTGAACG

### 6.1.6.3 Sequenzierungsprimer

Primer	Sequenz in 5'-3'-Richtung
Dsc2 seq F1	TTTTCTGTGTACGATTTAAAGG
Dsc2 seq F2	AGACATCACCTTTAATTAAGCC
Dsc2 seq F3	TCCAAACAGGTTGCATATGG
Dsc2 seq F4	TTGCAGAACTCAATAGAAAACC
Dsc2 seq F5	CACATACTGATACATAGCCTTGC
Dsc2 seq F6	CTTTCTCTCTGTGTACATCCACC
Dsc2 seq F7	TCTTCAATGTGACATGAAACAGC
Dsc2 seq F8	GTGGTGCTTTTCTTATGATACC
Dsc2 seq F9	TTTCCACAATGTTTCAGACTTACC
Dsc2 seq F10	ACAATGCCTTCAAATGAAGC
Dsc2 seq F11	CATGAAAGGGTTGTTTGATCC
Dsc2 seq F12	CCACTAAGACTTCCATGTACGG
Dsc2 seq F13	GGCTGATGACTGAGCTTAGC
Dsc2 seq F14	CTTTTGGCTAAGAACTTTGC
Dsc2 seq F15	TGGTACTGTCTCACACATGTTGC
Dsc2 seq F16	CTGATGCCTGTAAAGAAGTCG
Dsc2 seq F17	TGAGTTTGAAGGTGTTCTTGG
Dsc2 seq F18	GTAGTGTGCCGTCTCTAATAGC
Dsc2 seq F19	GCAAAGAAGCTTTACTATATGG
Dsc2 seq F20	CAGGTGTTTACTTAGCCAAGC
Dsc2 seq F21	GGGACACAAAGCCATAGTGC
Dsc2 seq F22	AGATCTTTCTTGGTCCCTG
Dsc2 seq F23	GGGGATGAAGTAGTTATCAACC
Dsc2 seq F24	TTGTGCACACATTTTGCAGC
Dsc2 seq F25	CTGGGACTACAGGCAGATGC
Dsc2 seq F26	CTTTAGATCCAGTCTGACACAGC
Dsc2 seq F27	GGATTGTTCCACTTACAAAGG
Dsc2 seq F28	AATTCCATTCCCAGCACC
Dsc2 seq F29	CAAAAGACTGCATGTATTCTGG
Dsc2 seq R1	CTTTAATAGTTCGTCTGCTTGG

Dsc2 seq R2	CATTCAAATCCATGGTTTGG
Dsc2 seq R3	ATACTCTTTAGTAGACCCTAGTAGC
Dsc2 seq R4	ACATCCCAGGAGCTACAGAGC
Dsc2 seq R5	ATCACATAAGGAATTGATCGG
Dsc2 seq R6	TAGGGGACTTTTCGAGATAGC
Dsc2 seq R7	ACTCAAAGTCTCAAGTATAGCAGG
Dsc2 seq R8	ATGGCTTCTTCATCACCTCC

#### 6.1.6.4 Primer für die Real-time PCR

Für die Real-time PCR wurden die TaqMan® Gene Expression Assays von Applied Biosystem verwendet.

Gen	Assay	Fluorophor
ANF	Mm01255747_g1	FAM
BNP	Mm00435304_g1	FAM
Dsc1	Mm00496525_m1	FAM
Dsc2	Mm00516355_m1	FAM
Dsc3	Mm00492270_m1	FAM
Dsg2	Mm01158185_m1	FAM
E-Cadherin	Mm01247357_m1	FAM
Gapdh	NM_008084.2	VIC
$\alpha$ MHC	Mm01313844_mH	FAM
$\beta$ MHC	Mm00600555_m1	FAM
N-Cadherin	Mm00483213_m1	FAM

#### 6.1.7 Antikörper

Primär-Antikörper	Ursprung	Referenz
AKT-XP (pan)	Kaninchen	Cell Signaling (Frankfurt am Main)
$\beta$ -Catenin-XP	Kaninchen	Cell Signaling (Frankfurt am Main)
Cx43/GJA	Kaninchen	Abcam (Cambridge, UK)
Desmocollin 2	Kaninchen	Ein Geschenk von D. Garrod
Desmoglein 2	Maus	Progen (Heidelberg)
Desmoplakin	Maus	Progen (Heidelberg)
Dysferlin	Maus	Leica Biosystem (Nussloch)
Dystrophin	Kaninchen	Abcam (Cambridge, UK)
E-Cadherin	Maus	BD Bioscience (Heidelberg)
Gapdh	Maus	Thermo Scientific
HSP25	Kaninchen	Cell Signaling (Frankfurt am Main)
MAPK p42/44 (pan)	Kaninchen	Cell Signaling (Frankfurt am Main)
N-Cadherin	Kaninchen	Santa Cruz (Heidelberg)
p38	Kaninchen	Cell Signaling (Frankfurt am Main)
Phospho p38	Kaninchen	Cell Signaling (Frankfurt am Main)
Phospho AKT-XP (Ser 473)	Kaninchen	Cell Signaling (Frankfurt am Main)
Phospho HSP25 (Ser 82)	Kaninchen	Cell Signaling (Frankfurt am Main)



Phospho MAPK p42/44 (Thr202/Tyr204)	Kaninchen	Cell Signaling (Frankfurt am Main)
Plakoglobin ( $\gamma$ -Catenin)	Maus	BD Bioscience (Heidelberg)
Plakophilin 2	Maus	Progen (Heidelberg)

Sekundär-Antikörper	Ursprung	Referenz
$\alpha$ -Maus IgG HRP	Pferd	Cell Signaling (Frankfurt am Main)
$\alpha$ -Kaninchen IgG HRP	Ziege	Cell Signaling (Frankfurt am Main)
$\alpha$ -Maus IgG AlexaFluor 488	Ziege	Invitrogen (Darmstadt)
$\alpha$ -Maus IgG AlexaFluor 555	Ziege	Invitrogen (Darmstadt)
$\alpha$ -Kaninchen IgG AlexaFluor 488	Ziege	Invitrogen (Darmstadt)
$\alpha$ -Kaninchen IgG AlexaFluor 555	Ziege	Invitrogen (Darmstadt)

### 6.1.8 Kits

Kit	Firma
ApopTag® Fluorescein Direct In Situ Apoptosis Detection Kit	Millipore (Darmstadt)
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystem (Darmstadt)
DC Protein Assay	Bio-Rad (München)
illustraMicroSpin G-25 Columns	Amersham (Freiburg)
Megaprime labeling Kit RPN1605	Amersham (Freiburg)
NucleoBond PC 500	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel (Düren)
RNase-free DNase-set	Qiagen (Hilden)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen (Hilden)
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystem (Darmstadt)

### 6.1.9 Puffer & Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Angesäuertes Ethanol	1% Essigsäure in 70% EtOH
Angesäuertes Wasser	0,5% Essigsäure in H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>
Antikörper-Lösung	0,05% Tween 20 (v/v); 0,1% TritonX-100 (v/v); 0,05% NaN <sub>3</sub> ; 1% BSA (w/v) in PBS
APS, 10%	10% Ammoniumpersulfat (w/v) in H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>
Denaturierungspuffer	1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH
ECL-Lösung	100 mM Tris pH 8,8; 0,009% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; 0,2 mM Cumarinsäure, 1,25 mM Luminol
Eosin	0,5% Eosin angesäuert (2Tropfen Essigsäure/100 ml)
Hybridisierungspuffer	2× SSC; 1× Denhardt's solution; 0,2% SDS; 5% Dextranulfat; 10 mg/ml Heringssperma-DNA
LB-Agar	LB-Medium mit 1,5% Agar (w/v)
Luria-Bertani (LB)-Medium	1% Trypton (w/v); 0,5% Bacto-Hefeextrakt (w/v); 1% NaCl(w/v)

Lysis-Puffer	100 mM Tris pH 7,4; 10 mM EDTA; 0,2% SDS; 200 mM NaCl
Milchpuffer, 5%	5% (w/v) Milchpulver in 1× TBST
Neutralisierungspuffer	1 M Tris; 1,5 M NaCl
P1-Puffer	15 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA
P2-Puffer	0,2 M NaOH; 1% SDS
P3-Puffer, pH 5,5	3 M Kaliumacetat
PBS, pH 7,4	0,01 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,01 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,14 M NaCl; 0,003 M KCl
PFA, 4%	4% Paraformaldehyd (w/v) in PBS
Phosphatpuffer, 0,1 M, pH 7,2	36% (v/v) Lösung A (0,05 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ); 14% (v/v) Lösung B (0,05 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ )
Picrosirius-Red-Lösung	0,1% Direct Red 80 (w/v) in Pikrinsäure
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCL pH 8,0; 150 mM NaCl; 1% NP40 (v/v); 0,5% DOC (w/v); 0,1 mM EDTA
SDS-Elektrophoresepuffer, 10×	30,3 g Tris; 141,5 g Glycin; 1% SDS (v/v); ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_d$
SDS-Ladepuffer; 5×	125 mM Tris pH 6,8; 56 mM EDTA pH 6,8; 10% SDS (w/v); 10% $\beta$ -Mercaptoethanol (v/v); 0,05% Bromphenolblau (w/v); 50% Glycerin (v/v)
SOC-Medium	2% Trypton (w/v); 0,5% Hefeextrakt (w/v); 8,6 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM $\text{MgCl}_2$ ; 20 mM Glukose
SSC-Puffer, 20×, pH 7,0	3M NaCl; 0,3 M Trinatriumcitrat
TBS, 10×, pH 7,6	200 mM Tris; 1,4 M NaCl
TBST	0,1% Tween (v/v) in 1× TBS
Transferpuffer, 1×	5,8 g Tris; 2,9 g Glycin; 10% Methanol (v/v); ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_d$
TTE-Puffer, 1×	90 mM Tris; 30 mM Taurin; 1mM EDTA
Waschlösung 1 (Southern Blot)	2× SSC; 0,1% SDS
Waschlösung 2 (Southern Blot)	0,2× SSC; 0,1% SDS

#### 6.1.10 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät/Material	Firma
Bakterienschtüttler Labtherm	Liebisch (Bielefeld)
Brutschrank	Heraeus (Osterode)
Einbettkassetten Rotilab	Roth GmbH (Karlsruhe)
Elektronenmikroskop „Morgagni“	FEI (Frankfurt am Main)
Elektronenmikroskop 910	Zeiss (Hamburg)
Elektrophorese-Kammer HE99X	Hoefer (Holliston, USA)
Elektroporationsküvetten IMM/100UI	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Elektroporator Gene Pulser	BioRad (München)
Fluoreszenz-Mikroskop BZ-8000	Keyence (Berlin)
Geldokumentation UVT-28M	Herolab (Wiesloch)
Homogenisator Precellys 24	Peqlab (Erlangen)
Hybridisierungsöfen OV1	Biometra GmbH (Göttingen)
iQ <sup>TM</sup> -5 Real-time PCR-Maschine	BioRad (München)
Keramikaufschlusskit	Peqlab (Erlangen)

Konfokales Laser Scanning Mikroskop SPE	Leica (Wetzlar)
Kryo-Einbettkassetten Disposable Base Molds	Fisher HealthCare (Houston, USA)
Kryostat CM1950	Leica (Wetzlar)
Kühlzentrifuge 5402	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Micro osmotic pumps 1002	ALZET (Cupertino, Kanada)
Mikrotom Microm HM355S	Thermo Fisher Scientific (Waldorf)
Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	BioRad (München)
NanoDrop Spektrophotometer ND-1000	Peqlab (Erlangen)
Nitrozellulose-Membran	Licor (Bad Homburg)
Objektträger Superfrost Plus	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig,
Odyssey Imaging System	Licor (Bad Homburg)
Paraffineinbettung EC350-1	Microm (Walldorf)
PCR-Thermocycler Terad2	BioRad (München)
PCR-Tubes	BRAND GmbH, Gießen
Phosphorimager-Platte	GE Healthcare, Freiburg
Pipetten	Gilson (Middleton, USA)
Pipettenspitzen	VWR (Darmstadt)
Pipettenspitzen, gestopft	Sorenson (Salt Lake City, USA)
Plastikwaren (Pipetten, Falcons)	Greiner Bio-one (Frickenhäusen)
Plastikwaren (Reaktionsgefäße)	Sarstedt (Nümbrecht)
PowerPac HC	BioRad (München)
Präparierbesteck	FST (Bad Oeynhausen)
Real-time PCR-Maschine ViiA7	Applied Biosystem (Darmstadt)
Sequenzierer 3100 Avant Genetic Analyzers	Applied Biosystem (Darmstadt)
Skalpelle	Braun (Kronberg)
SmartSpec™ 3000 Photometer	BioRad (München)
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Ultrazentrifuge J2-HS	Beckman (Krefeld)
Vertikales Elektrophoresesystem Mini PROTEAN Tetra Cell	BioRad (München)
Vevo 2100 High-Resolution Imaging System	Visual Sonics (Toronto, Kanada)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (Karlsruhe)
Waagen	Kern & Sohn GmbH (Balingen)
Wasserbad HI1210	Leica (Wetzlar)

### 6.1.11 Software

Software	Referenz
Adobe Illustrator CS4	Adobe Systems (München)
Adobe Photoshop CS5	Adobe Systems (München)
BZ image analysis application	Keyence (Berlin)
Image Studio Vs. 2.0	Licor (Bad Homburg)
ImageJ	<a href="http://rsbweb.nih.gov/ij/">http://rsbweb.nih.gov/ij/</a>
iQ™5 Optical System Software	BioRad (München)
Lasergene SeqBuilder	DNASTAR (Madison, USA)
Leica Application Suite	Leica (Wetzlar)
Nanodrop ND-1000 v3.3	Peqlab (Erlangen)
SaqMan	DNASTAR (Madison, USA)
Soft imaging (si)Viewer	Olympus (Münster)
ViiA™7	Applied Biosystem (Darmstadt)

## 6.2 Methoden

### 6.2.1 Mikrobiologische Arbeitstechniken

#### 6.2.1.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Elektrokompetente *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen wurden wie folgt hergestellt. Alle Zentrifugationsschritte fanden bei 4°C, 4000 rpm statt und dauerten 25 min. Zunächst wurden 5 ml LB-Medium mit einer Glycerindauerkultur inokuliert und über Nacht bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Anschließend wurden 1 l LB-Medium mit 1 ml dieser Vorkultur angeimpft und bis zum Erreichen einer optischen Dichte  $OD_{600} \geq 0,6$  bei 37°C geschüttelt. Die Messung der  $OD_{600}$  erfolgte mit einem UV/VIS Spektrophotometer (BioRad) gegen eine Referenz reinen LB-Mediums. Daraufhin wurden die Bakterien in einer Ultrazentrifuge (Beckmann, Rotor JA10) pelletiert, in 200 ml autoklaviertem, eiskaltem H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> resuspendiert, abzentrifugiert und in 100 ml autoklaviertem, eiskaltem H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> gelöst. Nach erneuter Zentrifugation folgte ein Waschschriff mit 20 ml eiskaltem 10%igen Glycerol, woraufhin die Zellen abermals pelletiert und anschließend in 1 ml 10%igen Glycerol aufgenommen wurden. Aliquote zu je 70  $\mu$ l wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### 6.2.1.2 Transformation von Bakterien mittels Elektroporation

Die elektrokompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 25  $\mu$ l der Bakteriensuspension mit 10 ng Plasmid bzw. 1-5  $\mu$ g BAC-DNA in einer vorgekühlten Küvette im Elektroporator (BioRad) bei 1.7 V, 25  $\mu$ F, 200  $\mu\Omega$  transformiert. Daraufhin wurden die Zellen sofort mit 450  $\mu$ l SOC-Medium supplementiert und bei 37°C unter Schütteln 1 h inkubiert. Das Ausplattieren erfolgte auf entsprechenden antibiotikahaltigen LB-Platten, wofür typischerweise 20  $\mu$ l und 200  $\mu$ l des Transformationsansatzes verwendet wurden.

## **6.2.2 DNA-Arbeitstechniken**

### **6.2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese**

PCR- und Klonierungs-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Dazu wurden die DNA-Proben auf ein 0,6-1%iges Agarosegel aufgetragen, welches 0,2 µg/ml Ethidiumbromid (Roth) enthielt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 100 V für ca. 60 min in einer mit TTE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer. Die Gele wurden anschließend mit einem UV-Transluminator (Herolab) dokumentiert.

### **6.2.2.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

Die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit dem QIAquick Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aus dem Agarosegel extrahiert.

### **6.2.2.3 Isolierung genomischer DNA aus murinen ES-Zellklonen**

Die Isolation der genomischen DNA aus ES-Zellen erfolgte nach der Methode von Ramirez-Solis (Ramirez-Solis, 1992). Dazu wurden die Klone unter Selektionsdruck (G418) auf einer gelatinisierten 96-well Platte bis zur Konfluenz kultiviert und nach Entfernen des Mediums in 50 µl Lysis-Puffer + 1 mg/ml Proteinase K über Nacht bei 55°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Ethanolpräzipitation der DNA (nach Sambrook, 1989), die zur Untersuchung eines möglichen Rekombinationsereignisses vollständig für Southern Blot-Analysen eingesetzt wurde.

### **6.2.2.4 Natriumchlorid-Extraktion genomischer DNA**

Die Extraktion der genomischen DNA wurde mit 50-100 mg Gewebe durchgeführt. Hierfür erfolgte zunächst ein Verdau in 400 µl Lysepuffer, versetzt mit 0,4 mg/ml Proteinase K, bei 55°C für mind. 1 h. Nach der Zugabe von 300 µl 3 M NaCl fand eine 30-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm, 4°C statt, woraufhin der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Volumen Isopropanol versetzt wurde. Es folgten eine 1-stündige Inkubation bei -20°C sowie ein Zentrifugationsschritt für 20 min bei 14000 rpm, 4°C. Die präzipitierte DNA wurde anschließend mit 500 µl

70%igem EtOH gewaschen, weitere 5 min bei 4°C, 14000 rpm zentrifugiert und in sterilem H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> (pH: 7,0) aufgenommen.

#### **6.2.2.5 Isolierung bakterieller DNA**

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte je nach Kulturansatz (Minipräparation: 5 ml, Maxipräparation: 100 ml) mit dem NucleoSpin® Plasmid oder dem NucleoBond® PC500 Kit (Macherey-Nagel) entsprechend der Herstellerangaben.

Bacterial artificial chromosome (BAC)-DNA wurde aus einer 2 ml Übernacht-Kultur wie folgt isoliert, wobei alle Zentrifugationsschritte bei RT stattfanden. Zunächst wurde das bei 6000 rpm, für 2 min abzentrifugierte Bakterienpellet in 300 µl P1-Puffer und 100 µg/ml RNase A resuspendiert und nach dem Zugabe von 300 µl P2-Puffer 5 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 300 µl P3-Puffer und einer 10-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 10000 rpm für 20 min. Der Überstand wurde mit 600 µl Isopropanol versetzt, 10 Minuten bei RT inkubiert und die präzipitierte DNA bei 14000 rpm für 20 Minuten abzentrifugiert. Es folgte ein Waschschriff mit 70%igem EtOH und eine weitere Zentrifugation für 5 min bei 14000 rpm. Die aufgereinigte und luftgetrocknete DNA wurde anschließend in steriles H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> überführt und bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

#### **6.2.2.6 Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die DNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch mit Hilfe des NanoDrops (Peqlab) nach Anweisung des Herstellers bestimmt. Es wurden 1,5 µl der DNA aufgetragen und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen eine Referenz von purem Wasser gemessen. Die Reinheit der DNA wurde durch das A260/A280-Verhältnis bestimmt. Das Optimum liegt dabei bei einem Wert von ca. 1,8.

#### **6.2.2.7 DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierungen wurden unter Verwendung des Abi Prism BigDye Terminator Kit 3.1 (Applied Biosystem) und des Hi-Di Formamids (Applied Biosystem) nach der Didesoxymethode nach Sanger durchgeführt (Sanger F., 1975). Der BigDye Master-

Mix enthielt bis auf den Primer alle, für die Sequenzierreaktion notwendigen Reagenzien. Ein Ansatz von 10 µl bestand aus 300 ng Plasmid-DNA, 2 µl BigDye und 1,5 µl forward oder reverse Primer (5 µM). Die PCR-Reaktion wurde nach dem in Tab. 2 aufgeführten Programm in einem Thermocycler durchgeführt. Im Anschluss wurden die Sequenzier-Produkte über Sephadex (Sigma-Aldrich) durch eine 7-minütige Zentrifugation mit 4000 rpm bei 10°C aufgereinigt und nach der Zugabe von 10 µl Hi-Di in einem Kapillarsequencer 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) sequenziert. Die Analyse und der Abgleich der Sequenzdaten erfolgte mit dem Programm SaqMan von DNASTAR.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	94°C	3 min	
2	94°C	30 sec	24
	50°C	30 sec	
	60°C	3 min	
3	60°C	5 min	-
4	12°C	∞	-

Tab. 2: Programm einer Sequenzierreaktion.

#### 6.2.2.8 DNA-Restriktion

Die Restriktion der DNA mit Endonukleasen wurde mit dem jeweiligen Enzym (NEB) unter den vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen bei 37°C über Nacht durchgeführt. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 65°C für 10 min.

#### 6.2.2.9 DNA-Ligation

Mittels Ligation wurden restringierte DNA-Fragmente in einen entsprechend verdauten Vektor kloniert. Ein Ligationsansatz von insgesamt 5 µl bestand aus 25 ng Plasmid-DNA, jeweils 8 ng Insert-DNA, 0,5 µl 10× Ligationspuffer (NEB) sowie 1 µl T4-DNA-Ligase (NEB) und wurde 1 h bei 16°C inkubiert.

#### 6.2.2.10 Genotypisierung

Die Genotypisierung transgener Mäuse erfolgte mittels PCR-Amplifikation spezifischer, genomischer DNA-Abschnitte. Um die DNA 3 Wochen alter Tiere zu

isolieren, wurden Ohrbiopsien entnommen, mit 45 µl Lysepuffer und 5 µl Proteinase K (10 mg/ml) versetzt und über Nacht bei 55°C verdaut. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 95°C inaktiviert und bei 14000 rpm kurz abzentrifugiert. Die Überstände wurden 1:20 verdünnt und jeweils 2 µl für die Genotypisierungs-PCR eingesetzt. In Abhängigkeit von der Genotypisierung wurde die PCR mit der Taq-Polymerase von Qiagen (Dsc2, Flp) oder der Taq-Polymerase von NEB (Cre) unter Verwendung des zugehörigen Puffers durchgeführt. Ein Reaktionsansatz von 25 µl bestand aus 2,5 µl 10× PCR-Puffer, 0,1 mM dNTPs, jeweils 5 pmol forward- und reverse-Primer, 2 µl DNA (1:20 verdünnt) und 0,5 U (Qiagen) bzw. 0,75 U (NEB) Taq-Polymerase. Der Reaktionsansatz der NEB-Polymerase enthielt zusätzlich 2,5 µl 10× Bromphenolblau. Für die PCR wurde folgendes Programm verwendet: Tab. 3.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	95°C	3 min	
2	95°C Annealing-Temperatur 72°C	30 sec 30 sec 1 min	35
3	72°C	10 min	-
4	12°C	∞	-

Tab. 3: Programm einer Genotypisierungs-PCR.

#### 6.2.2.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Klonierung des Dsc2-Targeting-Konstruktes wurden die Recombineering-Arme, die Neomycin-Kassette sowie die loxP-Stellen mittels der KOD DNA-Polymerase (Novagen) unter Verwendung der mitgelieferten Reagenzien (MgSO<sub>4</sub>, dNTPs, Puffer) amplifiziert. Ein PCR-Ansatz von 50 µl setzte sich wie folgt zusammen: 5 µl 10× Puffer, 1,5 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,2 mM dNTPs, jeweils 0,3 µM forward- und reverse-Primer, 10 ng Template-DNA und 0,02 U/µl KOD-Polymerase. Die PCR erfolgte unter den in Tab. 4 aufgeführten Reaktionsbedingungen in einem Thermocycler.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	94°C	2 min	
2	94°C Annealing-Temperatur 72°C	15 sec 30 sec 1 min	35
3	2°C	∞	-

Tab. 4: Programm einer KOD DNA-Polymerase PCR.



#### 6.2.2.12 Southern Blot

Für Southern Blot-Analysen wurde die genomische DNA (gDNA) aus ES-Zellklonen isoliert, in einem Restriktionsendonukleaseansatz mit HpaI spezifisch restringiert und bei 100 V in einem 0,65%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss wurde das Gel zur Depurinisierung in Denaturierungspuffer überführt, 2 × 20 min inkubiert und im Weiteren für 2 × 20 min in Neutralisierungspuffer neutralisiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift in 2× SSC-Puffer, bevor die DNA mittels „upward“-Kappilartransfer in 20× SSC-Puffer über Nacht auf eine Nylonmembran (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham) übertragen wurde. Nach der UV-Fixierung der DNA fand eine 1-stündige Präinkubation der Membran in 30 ml Hybridisierungspuffer bei 55°C statt, um freie Bindungskapazitäten abzusättigen. Darauf folgte die Hybridisierung mit einer spezifischen radioaktiv markierten Sonde bei 60°C über Nacht, worauf sich am nächsten Tag jeweils ein Waschschrift für 15 min bei 65°C mit Waschlösung 1 und 2 anschlossen. Abschließend wurde die Membran in Saranfolie eingeschlagen und auf Phosphorimager-Platten für mehrere Stunden exponiert.

#### 6.2.2.13 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Zur Herstellung der DNA-Sonden für die Southern-Detektion wurde zunächst gDNA mittels Natrium-Chlorid-Extraktion aus murinen Schwanzbiopsien isoliert und spezifische Sequenzabschnitte mit der KOD DNA-Polymerase (Novagen) in einem Reaktionsansatz von 50 µl nach Angaben des Herstellers amplifiziert (6.2.2.11). Die radioaktive Markierung der geextrahierten dsDNA-Produkte erfolgte unmittelbar vor Verwendung mit dem Megaprime labeling Kit (Amersham), wobei 100 ng der DNA und ca. 0,5 MBq [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (Perkin-Elmer) eingesetzt wurden. Der Einbau des radioaktiv markierten Nukleotids fand bei 37°C für 15 min statt. Hierfür wurde die DNA nach einem Denaturierungsschritt (95°C, 4 min) entsprechend der Herstellerangaben mit randomisierten Oligonukleotiden in einem PCR-Ansatz der Klenow-Polymerase versetzt. Nach dem Entfernen nicht gebundener Nukleotide mit Hilfe von MicroSpin G-25 Säulen (Amersham), wurde die markierte Sonde zur weiteren Verwendung für 3 min bei 95°C inkubiert und mit der immobilisierten gDNA im Southern Blot-Verfahren hybridisiert.

### **6.2.3 RNA-Arbeitstechniken**

#### **6.2.3.1 RNA-Extraktion aus murinem Gewebe**

Die RNA wurde mit dem RNeasy mini kit (Qiagen) isoliert. Dazu wurde das in Flüssigstickstoff schockgefrorene Gewebe in 500 µl Trizol (Invitrogen) aufgenommen und mit einem Keramikaufschlusskit im Homogenisator (Peqlab) unter folgenden Einstellungen vollständig lysiert: 5000 rpm für 20 sec, 20 sec Pause, 5000 rpm für 20 sec. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wurden die Proben mit 100 µl Chloroform versetzt und sofort für 15 sec invertiert. Es folgte eine erneute Inkubation von 2-3 min bei RT und anschließend eine Zentrifugation für 20 min bei 14000 rpm, 4°C. Nach der erfolgten Phasenseparation wurde der wässrige Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die RNA nach Angaben des Herstellers über die RNeasy Mini spin Säule (Qiagen) aufgereinigt. Um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen, wurde ergänzend ein DNaseI Verdau mit dem RNase-free DNase-set (Qiagen) entsprechend der Herstellerangaben auf der Säule durchgeführt. Die RNA wurde in 60 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80°C gelagert.

#### **6.2.3.2 Bestimmung der RNA-Konzentration**

Die RNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch mit Hilfe des NanoDrops (Peqlab) bestimmt. Es wurden 1,5 µl der isolierten RNA aufgetragen und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen eine Referenz von purem Wasser gemessen. Eine Absorption von 1 bei 260 nm entspricht dabei einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Zusätzlich wurde das A260/A280-Verhältnis bestimmt, um die Reinheit der RNA zu überprüfen. Das Optimum liegt dabei bei einem Wert von ca. 2,0.

#### **6.2.3.3 Reverse Transkription**

Das Umschreiben der extrahierten RNA in cDNA erfolgte mit der M-MuLV Reversen Transkriptase (NEB), wobei 2 µg RNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µl transkribiert wurden. Zunächst wurde ein Reaktionsansatz von 17 µl, bestehend aus 1 µl Random Hexamer Primer (50 µM), 1 µl dNTPs (10 mM), 1 µg RNA und RNase-

freiem Wasser für 10 min bei 65°C und anschließend für 1 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben mit 2 µl 10× Reaktionspuffer versetzt, 2 min bei 25°C inkubiert und nach dem Hinzufügen von jeweils 1 µl Reverser Transkriptase mit folgendem Programm umgeschrieben (Tab. 5).

Schritt	Temperatur	Zeit
1	25°C	10 min
2	42°C	60 min
3	90°C	10 min
4	4°C	∞

Tab. 5: Programm einer Reversen Transkription.

#### 6.2.3.4 Quantitative Real-time PCR

Die mRNA-Expression spezifischer Gene wurde mittels quantitativer Real-time PCR (QRT-PCR) bestimmt. Diese Methode bietet die Möglichkeit die Amplifikationsprodukte in Echtzeit zu detektieren und gleichzeitig zu quantifizieren. Die Messung der Amplifikate wird mit Hilfe von fluoreszierenden Molekülen durchgeführt, wobei die Fluoreszenz proportional mit der Menge der DNA ansteigt. Es existieren mehrere Grundtypen von Fluoreszenzmolekülen, die in der QRT-PCR angewendet werden. Man unterscheidet zwischen DNA-Farbstoffen wie SYBR-Green und sequenzspezifischen fluoreszierenden Sonden, wie z.B. TaqMan-Sonden. Letzteres wurde auch in dieser Arbeit eingesetzt. Bei den TaqMan-Sonden handelt es sich um Oligonukleotide deren 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff und das 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff markiert ist. In der intakten Sonde wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs durch den Quencher aufgrund seiner räumlichen Nähe unterdrückt. Hybridisiert die Sonde während der PCR jedoch mit ihrer spezifischen Zielsequenz, wird sie durch die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der DNA-Polymerase gespalten und der Quencher von dem Reporter-Farbstoff getrennt, wodurch nach Anregung mit ultravioletten Licht eine messbare Fluoreszenz entsteht. Dieses Fluoreszenzsignal steigt entsprechend der Akkumulation des Produktes mit jedem PCR-Zyklus an.

Die Real-time PCR bietet zwei prinzipielle Möglichkeiten der Quantifizierung, die absolute und die relative. Grundlage bildet jeweils der sogenannte  $C_t$ -Wert, der den Zyklus beschreibt in dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundsignalstärke ansteigt. Die relative Quantifizierung wurde auch für die hier

durchgeführten PCR-Ansätze verwendet. Sie beruht auf der Normalisierung der Werte zu einem Referenzgen, wie z.B. Gapdh oder  $\beta$ -Aktin, wodurch Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA ausgeglichen werden können.

Die Quantifizierung der Genexpression mittels QRT-PCR erfolgte mit dem TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystem) in einem iQ<sup>TM</sup>-5 (Bio-Rad) bzw. einem ViiA7 Thermocycler (Applied Biosystem). Ein Reaktionsansatz von 20  $\mu$ l enthielt 5 ng cDNA, 10  $\mu$ l TaqMan® Gene Expression Master Mix (2 $\times$ ) (Applied Biosystem) und 1  $\mu$ l TaqMan Gene Expression Assay (20 $\times$ ). Für jede cDNA-Probe wurden das Referenzgen (Gapdh) und das zu untersuchende Gen in Triplikaten angesetzt. Das Programm für die QRT-PCR ist in Tab. 6 aufgeführt.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	50°C	2 min	-
2	95°C	10 min	-
3	95°C 60°C	15 sec 1 min	40

Tab. 6: Programm einer Real-time PCR.

## 6.2.4 Proteinbiochemische Methoden

### 6.2.4.1 Gesamtproteinextraktion aus murinem Gewebe

Für die Proteinisolation wurde das in Flüssigstickstoff schockgefrorene Gewebe in 400-500  $\mu$ l, mit Proteinase-Inhibitoren (complete mini proteinase inhibitor cocktail, Roche) und Phosphatase-Inhibitoren (5 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) versetztem, RIPA-Puffer aufgenommen und im Homogenisator (Peqlab) unter Verwendung eines Keramikaufschlusskits homogenisiert. Dazu wurde folgendes Programm verwendet: 5500 rpm für 20 sec, 20 sec Pause, 5500 rpm für 20 sec. Um eine vollständige Lyse des Gewebes zu gewährleisten, wurden die Proben für mind. 1 h bei 4°C inkubiert und anschließend für 15 min bei 14000 rpm, 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die Proteinkonzentration nach Lowry bestimmt.

### 6.2.4.2 Proteinkonzentrationsmessung nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry beruht auf zwei Reaktionen, der Biuretreaktion und der Reduktion des Folin-Ciocalteu-Reagenz zu Molybdänblau. Zunächst wurden

22,5 µl der 1:10 verdünnten Proteinproben mit 127 µl Reagenz A und 2,5 µl Reagenz S (DC Protein Assay, BioRad) versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Die zweite Reaktion erfolgte durch die Zugabe von 1 ml Reagenz B (DC Protein Assay, BioRad). Nach einer Inkubation von 15 min bei RT wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 750 nm in einem Spektrophotometer (BioRad) gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer mitgeführten BSA-Eichgeraden bestimmt.

#### 6.2.4.3 Western Blot

Bei der Western Blot-Analyse werden die Proteine zunächst in einem Polyacrylamid-Gel (Tab. 7) entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden gleiche Mengen an Protein mit 5× SDS-Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 100 V in 1× SDS-Elektrophorese-Puffer. Anschließend wurden die Proben im Nass-Blot-Verfahren mittels Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran (Licor) geblottet. Der Blot wurde auf der Anode der Transfereinheit geschichtet, wobei Whatmanpapier, Membran und Gel in 1× Transferpuffer equilibriert und luftblasenfrei übereinander gelegt wurden. Nach dem Transfer bei 300 mA für 1h wurde die Membran in 5% Milchpuffer überführt und 1 h bei RT inkubiert, um unspezifische Proteinbindestellen zu blocken. Die anschließende Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C in entsprechender Verdünnung in 5% Milchpuffer. Danach wurde die Membran 3 × 5 min mit TBST gewaschen und 1 h bei RT mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (Cell Signaling) in 5% Milchpuffer inkubiert. Nach einem dreimaligen Waschen für 5 min mit TBST wurde die Membran 1 min in frisch angesetzter ECL-Lösung inkubiert und unmittelbar danach mit dem Odyssey-Imager (Licor) entwickelt.

<b>Trenngel</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	8,04 ml	6,7 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	5 ml	5 ml
10% SDS	200 µl	200 µl
30% Acrylamid 7 Bisacrylamid	6,66 ml	8 ml
10% APS	200 µl	200 µl
TEMED	20 µl	20 µl

Sammelgel	Menge
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	3,05 ml
0,5 M Tris, pH 6,8	1,25 ml
10% SDS	50 µl
30% Acrylamid 7 Bisacrylamid	650 µl
10% APS	50 µl
TEMED	5 µl

Tab. 7: Zusammensetzung von SDS-Polyacrylamid-Gelen.

## 6.2.5 Histologische Methoden

### 6.2.5.1 Paraffineinbettung

Frisch präparierte Herzen wurden transversal in drei Abschnitte geteilt und das mittlere Segment in Paraffin eingebettet. Dazu wurde das Gewebe für 24 h in 4% PFA/PBS fixiert und anschließend in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe dehydriert. Die Inkubation in 70% Ethanol erfolgte dabei über Nacht, alle weiteren Dehydrierungsschritte (80%, 90%, 96%, 2 × 99%) für 1 h bei 4°C. Im Anschluss wurde der Alkohol durch das Einlegen in Toluol (2 × 45 min) entfernt und das Gewebe über Nacht mit Paraffin durchtränkt, bevor es dann eingebettet wurde. Für histologische Übersichtsfärbungen, wie HE- oder Sirius Red-Färbungen, wurden mit einem Mikrotom (Thermo Fisher) 8 µm dünne Schnitte von den Paraffinblöcken angefertigt.

### 6.2.5.2 Kryoeinbettung

Von frisch präparierten Herzen wurde der basale Abschnitt für die Kryoeinbettung verwendet. Das Gewebe wurde direkt in Tissue Tek (Sakura) eingefroren, wobei der Gefrierprozess in, mit Trockeneis tiefgekühltem, Isopropanol durchgeführt wurde. Die vollständig erstarrten Blöcke wurden anschließend für mind. 24 h bei -80°C aufbewahrt, bevor mit einem Kryostat (Leica) 8 µm dünne Schnitte angefertigt wurden. Die Kryoschnitte wurden bis zur ihrer Verwendung für Immunfluoreszenzfärbungen bei -20°C gelagert.

### 6.2.5.3 Histochemie

Für alle histologischen Färbungen wurden die auf Objektträger aufgezogenen Paraffinschnitte für mindestens 30 min bei 60°C inkubiert, entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanol-Reihe rehydriert (Tab. 8). Nach der Färbung wurden die Schnitte erneut dehydriert und mit Fluka Einbettmedium (Sigma) eingedeckt.

Entparaffinierung	
Xylol	5 min
Xylol	5 min
Xylol	5 min
Rehydrierung	
99% Ethanol	3 min
99% Ethanol	3 min
96% Ethanol	3 min
70% Ethanol	3 min
Dehydrierung	
80% Ethanol	1 min
96% Ethanol	1 min
99% Ethanol	1 min
99% Ethanol	1 min
Xylol	3 min
Xylol	3 min

Tab. 8: Entparaffinierung, Rehydrierung und Dehydrierung von Paraffinschnitten.

#### 6.2.5.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Die HE-Färbung ist eine histologische Übersichtsfärbung, die Zellkerne blau und das Zytoplasma rot darstellt. Die entparaffinierten Schnitte wurden zunächst 30 sec in Hämatoxylin (Roth) gefärbt, 3 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen und zur Kontrastierung für wenige Sekunden in angesäuertes Ethanol überführt. Nach einem zweiten Waschschrift für 4 min unter fließendem Leitungswasser erfolgte eine 10-minütige Färbung mit Eosin (Roth). Die gefärbten, eingedeckten Schnitte wurden anschließend mittels Lichtmikroskopie (BZ-8000, Keyence) ausgewertet.

#### 6.2.5.3.2 Sirius Red-Färbung

Die Sirius Red-Färbung ist eine häufig angewandte Methode zur Darstellung von Fibrose im Gewebeschnitt. Dabei erscheint das Kollagen violett-rot vor einem orangefarbenen Hintergrund. Bei der Färbung wurden zunächst die Zellkerne durch eine 8-minütige Inkubation in Weigerts-Hämatoxylin (Roth) angefärbt. Danach wurden die

Schnitte 10 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen, für 1 h in Picrosirius-Red-Lösung überführt und abschließend  $2 \times 3$  min in angesäuertem Wasser gewaschen. Zur Auswertung wurde die Fibrose durch lichtmikroskopische Aufnahmen am BZ-8000 Mikroskop (Keyence) dokumentiert und mit Hilfe der Threshold-Funktion von ImageJ in Bezug zur Gesamtfläche quantifiziert.

#### **6.2.5.3.3 Quantifizierung der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche**

Die Querschnittsfläche der einzelnen Kardiomyozyten wurde anhand HE-gefärbter Transversalschnitte bestimmt. Pro Tier wurden jeweils 3 Aufnahmen des rechten Ventrikels, des linken Ventrikels und des Septums in 40-facher Vergrößerung am BZ-8000 Mikroskop (Keyence) aufgenommen. Die Flächenbestimmung quer angeschnittener Kardiomyozyten erfolgte mit der BZ image analysis application software (Keyence). Jeweils 10 Zellen wurden mit der „Area-Measure“-Funktion umrandet und die Querschnittsfläche automatisch kalkuliert.

#### **6.2.5.4 Immunfluoreszenzfärbung**

Der Nachweis spezifischer Proteine im Gewebeschnitt erfolgte über die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie. Alle Färbungen wurden dabei auf Kryoschnitten durchgeführt. Das Gewebe wurde zunächst mit 4% PFA/PBS für 10 min bei RT fixiert, kurz mit PBS gewaschen und für eine 1 h mit 5% NGS/PBS (normal goat serum) blockiert. Um Hintergrundfärbungen zu verringern, erfolgte bei primären Antikörpern murinen Ursprungs ein zusätzlicher Blockschritt für 30 min mit einem anti-Fab-Fragment (Jackson Laboratories), welches 1:25 in TBS verdünnt wurde. Anschließend wurden die Schnitte für 5 min mit 0,2% TritonX-100/PBS permeabilisiert und über Nacht bei 4°C mit den Primärantikörpern in entsprechender Verdünnung in Antikörper-Lösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für je 5 min erfolgte die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (Invitrogen) für 1 h bei RT. Abschließend wurden die Schnitte erneut  $3 \times 5$  min gewaschen, mit Prolong + DAPI (Invitrogen) eingedeckt und mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop Leica SPE mikroskopiert.



#### 6.2.5.5 TUNEL-Assay

Die TUNEL-Färbung (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) ist eine gängige Methode zur Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen die infolge von Apoptose entstehen. Das Prinzip basiert auf der Markierung freier 3'-OH-Enden durch den enzymatischen Einbau Dioxigenin-gekoppelter Nukleotide und deren Sichtbarmachung durch die Bindung eines Fluorescein-gekoppelten Antikörpers. Der TUNEL-Assay wurde auf Paraffinschnitten mit dem ApopTag® Plus Fluorescein *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Millipore) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt.

#### 6.2.6 Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden die Herzen mit 4% PFA/PBS für 10 min perfundiert, bevor der rechte und linke Ventrikel in PBS präpariert und für mind. 2 h in 2,5% Glutaraldehyd/0,1 M Phosphatpuffer fixiert wurden. Das Einbetten in Epon und die Anfertigung der Ultradünnschnitte sowie der Übersichtsfärbungen erfolgte durch die elektronenmikroskopische Core facility des Max-Delbrück-Centrums. Die Übersichts- und Detailaufnahmen wurden anschließend von Bettina Purfürst an einem EM „Morgagni“ der Firma FEI, ausgestattet mit einer CCD-Kamera Morada (Olympus SIS), bzw. am Zeiss EM 910 mit Hilfe einer 1K CCD- Kamera (Proscan) erstellt.

#### 6.2.7 Tierversuche

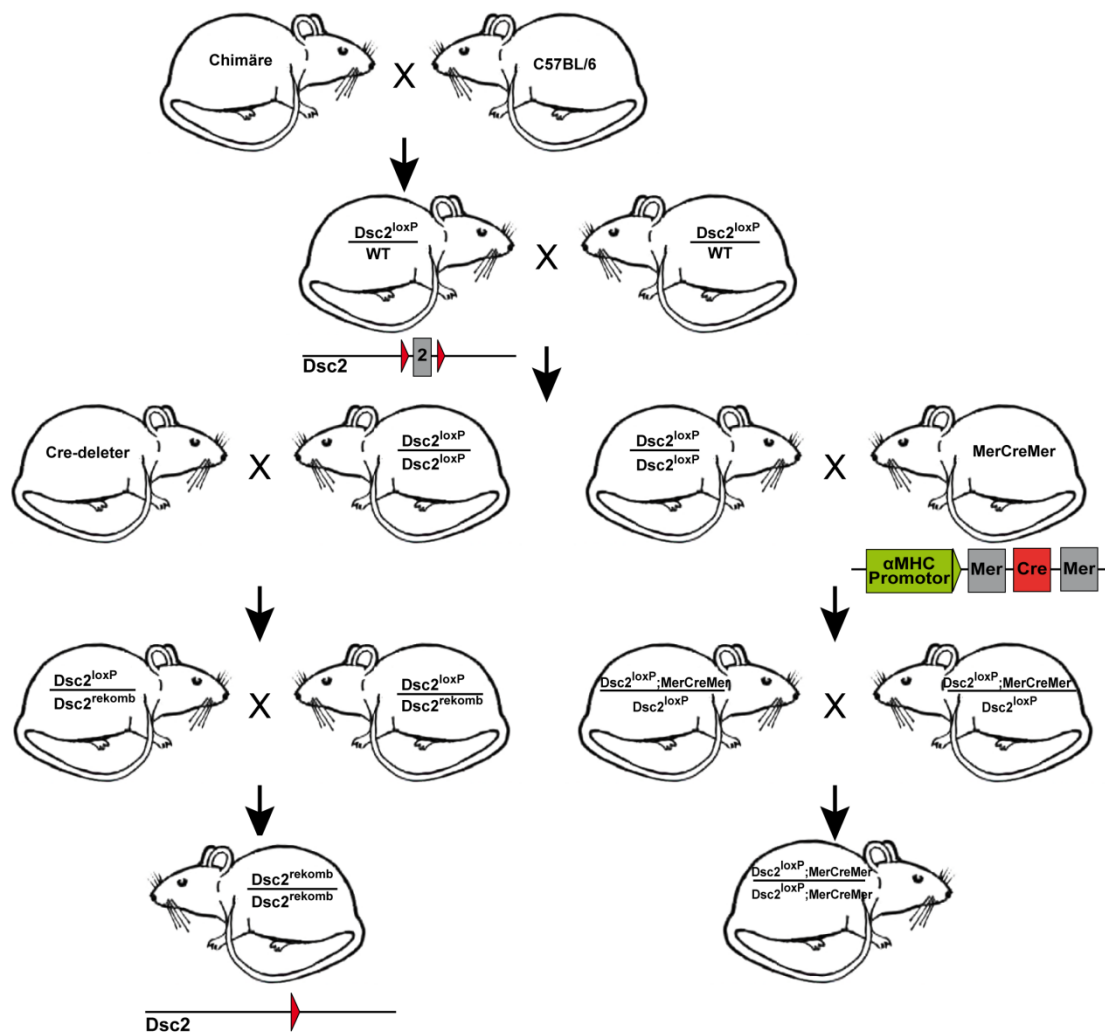
Für die in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurde der Mausstamm C57BL/6 verwendet. Alle Versuche waren von der Tierschutzkommission des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin (Reg 0176/08) genehmigt. Alle unter Narkose erfolgten Eingriffe wurden unter Berücksichtigung der veterinärmedizinischen Leitlinien (Wärmeunterlage, Überprüfung der Körpertemperatur, Aufwachen unter Wärmelampe etc.) durchgeführt.

##### 6.2.7.1 Generierung der Dsc2 Knockout-Mauslinie

Um ein Knockout-Modell für Dsc2 zu etablieren, wurde zunächst eine konditionale Dsc2-Mauslinie unter Verwendung des Cre/loxP-Systems generiert. Dieses, aus dem

Bakteriophagen P1 stammende System, basiert auf der Cre-induzierten DNA-Rekombination zwischen zwei Erkennungsstellen (loxP). Die loxP-Sequenzen bestehen jeweils aus zwei begrenzenden, palindromischen DNA-Sequenzmotiven und einem zentralen Element, welche in gleicher Orientierung die Exzision des dazwischen liegenden DNA-Abschnittes vermitteln. Die in dieser Arbeit hergestellte konditionale Mauslinie ist Träger eines geflochten Dsc2-Gens, in dem das Exon 2 durch zwei loxP Sequenzen flankiert wird. Die, durch die Cre-Rekombinase hervorgerufene Exzision von Exon 2, führt zu einer Leserasterverschiebung und zur Bildung eines frühzeitigen Stopp-Codons in Exon 3, sodass eine Nullmutation im Dsc2-Gen entsteht. Zur Generierung eines klassischen sowie eines herzspezifischen, induzierbaren Knockout-Modells, wurden die konditionalen Tiere mit dem Cre-deleter Mausstamm bzw. mit dem MerCreMer-Mausstamm verpaart. In den Cre-deleter Tieren wird Cre bereits in der Keimbahn exprimiert. Der MerCreMer-Stamm hingegen ist Träger einer induzierbaren, herzspezifischen Cre-Rekombinase, die der Kontrolle eines Tamoxifen-sensitiven  $\alpha$ MHC-Promotors unterliegt (Abb. 25).

Ein weiteres, in dieser Arbeit angewandtes, Rekombinationssystem ist das FLP/FRT-System. Analog zu Cre vermittelt FLP die Rekombination eines zwischen den FRT-Erkennungsstellen liegenden DNA-Abschnittes. Für die Selektion von ES-Zellen wurde eine Neomycin-Kassette mittels zwei FRT-Sequenzen markiert und an das 3'-Ende von Exon 2 kloniert. Um einen eventuellen Einfluss der Neomycin-Kassette in den transgenen Tieren ausschließen zu können, wurde diese anschließend durch die Verpaarung heterozygoter Dsc2-Mäuse mit dem FLP-Mausstamm aus dem Genom eliminiert.



**Abb. 25: Verpaarungsschema zur Generierung eines klassischen und eines herzspezifischen  $Dsc2$ -Knockout-Mausstamms.** Mittels Recombineering-Technik wurde eine konditionale Mauslinie ( $Dsc2^{loxP}$ ) generiert, in der das Exon 2 des  $Dsc2$ -Gens upstream und downstream von loxP-Sequenzen (rote Dreiecke) flankiert wird. Die durch die Cre-Rekombinase vermittelte Rekombination des geflochten Gens führt zu einer Leserasterverschiebung in Exon 3 und zur frühzeitigen Translationstermination von  $Dsc2$  ( $Dsc2^{recomb}$ ). Die Generierung des klassischen KO-Modells erfolgte durch Verpaarung mit dem Cre-deleter Stamm. Eine induzierbare, herzspezifische  $Dsc2$ -Mauslinie ging aus der Verpaarung mit dem MerCreMer-Mausstamm hervor.

#### 6.2.7.1.1 Herstellung des Targeting-Vektors

Die Herstellung des  $Dsc2$ -Targeting-Konstruktes erfolgte mittels Recombineering-Technik. Diese Methode basiert auf der Anwendung genetisch modifizierter *E. coli* Stämme, in denen eine effiziente Rekombination homologer DNA-Fragmente durch die Expression Phagen-kodierter Gene, wie die *Red*-Gene des Bakteriophagen  $\lambda$ , ermöglicht wird (Yu, 2000). Das Red-System umfasst die unter der Kontrolle des

temperatursensitiven  $\lambda$  cI857-Repressors stehenden Gene *exo*, *bet* und *gam*. *Exo* und *bet* sind rekombinationsrelevante Gene und kodieren für eine 5'-3' Exonuklease sowie für ein Einzelstrang-bindendes Protein (Beta). Eine hohe Effizienz des Rekombinations-Vorgangs wird zusätzlich durch das Gam-Protein gewährleistet, welches die RecBCD-Exonuclease, ein lineare dsDNA abbauendes Enzym von *E. coli*, inhibiert (Poteete, 2001). Aufgrund der temperatursensitiven Kontrolle des Phagen  $\lambda$  PL-Promotors durch den  $\lambda$  cI857-Repressor kann die Expression der Gene durch einen Temperaturshift von 32°C auf 42°C induziert werden. Auf Grundlage dieses Systems wurde der konditionale Dsc2-Rekombinationsvektor generiert. Der hierfür verwendete Ausgangsvektor pAEF wurde freundlicherweise von Herrn Masato Ohtsuka, die rekombinationseffizienten *E. coli* Stämme von Herrn Donald L. Court zur Verfügung gestellt. Das murine Dsc2-Gen wurde aus der C57BL/6J-RP23-BAC-Bibliothek isoliert (BAC-Klon: RP23-38O14; RZPD) und nach Ohtsuka *et al.* (Ohtsuka, 2007) in den pAEF-Vektor subkloniert. Nach dem gleichen System der Red-vermittelten homologen Rekombination erfolgte anschließend nach Liu *et al.* (Liu, 2003) die Insertion von jeweils einer loxP-Sequenz upstream und downstream von Exon 2 sowie einer, von zwei FRT-Sequenzen flankierten, Neomycin-Kassette an das 3'-Ende von Exon 2.

#### **6.2.7.1.2 Elektroporation muriner, embryonaler Stammzellen**

Die Transfektion des Dsc2-Targeting-Konstruktes in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) und die Generierung chimärer Mäuse wurde in Kooperation mit der Transgenic Core Facility des Max-Delbrück-Centrums Berlin durchgeführt. Für die Transfektion wurden ES-Zellen der Linie E14.1 in DMEM (supplementiert mit 15% FKS, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 1% nicht-essentiellen Aminosäuren, 100 µM  $\beta$ -Mercaptoethanol und 500 U/ml LIF) mit embryonalen Fibroblasten (Feeder-Zellen) bei 37°C, 7,5% CO<sub>2</sub> kokultiviert, abtrypsiniert und bei 300 g für 5 min pelletiert. Mittels Elektroporation (Genepulser, BioRad) wurden 10<sup>7</sup> Zellen in 800 µl PBS mit 20 µg des linearisierten Dsc2-Targeting-Vektors bei 240 V, 500 µF transfiziert und anschließend auf vier 10 cm-Zellkulturschalen kultiviert. Durch die Zugabe von 400 µg/ml G418 an Tag 1 und 2 µM Ganciclovir an Tag 5, erfolgte die Selektion homolog rekombinierter ES-Zellen. Die Vereinzelung der ES-Zellklone erfolgte im 96well-Format. Hierfür wurden die Zellkolonien nach 7-8 Tagen mit Hilfe

einer Pipette in 25 µl PBS in eine gelatinisierte Platte transferiert, in 25 µl Trypsin/EDTA-Lösung vereinzelt und die Wirkung des Trypsins durch 200 µl ES-Zellmedium inhibiert. Nach Erreichen vollständiger Konfluenz wurde die gDNA aus den ES-Zellen isoliert. Zwei mittels Southern Blot identifizierte homolog rekombinierte Zellklone wurden für die Blastozysteninjektion genutzt.

#### **6.2.7.2 Angiotensin II-Applikation**

Zur Induktion erhöhter Belastungsbedingungen wurde den Tieren im Alter von 15-20 Wochen Angiotensin II (Calbiochem) in einer Dosis von 1,4 mg pro kg Körpergewicht (KG) über 14 Tage verabreicht. Um eine konstante Applikation des Angiotensins über den gesamten Versuchszeitraum zu ermöglichen, wurden osmotische Minipumpen der Firma Alzet subkutan (s.c.) implantiert. Die Implantation erfolgte unter Inhalationsnarkose mit Isofluran (1-2 Vol.%). Als Analgetikum gegen den Wundschmerz bekamen die Mäuse einmalig Carprofen (5mg/kg KG) s.c. verabreicht.

#### **6.2.7.3 Operative Aortenkonstriktion (TAC)**

Das Aortenbanding zur Induktion einer kardialen Hypertrophie wurde an 8 Wochen alten Tieren unter Isoflurannarkose (1-2 Vol.%) von Astrid Schiche am Max-Delbrück-Centrum durchgeführt. Hierfür wurden die narkotisierten Mäuse auf einer Wärmeunterlage fixiert und der Aortenbogen freigelegt. Mittels einer stumpfen G26 Nadel und einem Nylonfaden erfolgte die Einengung der thorakalen Aorta um ca. 50%, sodass die Nachlast und folglich die Pumpfunktion des Herzens erhöht wurde. Hierfür wurde die Nadel neben die Aorta platziert und der Nylonfaden um die Nadel und Aorta geschlungen, zusammengezogen und verknotet. Daraufhin wurde die Nadel rasch entfernt, um den Blutfluss durch die nun verengte Aorta wieder freizugeben. Der Eingriff dauerte ca. 20-30 min. Perioperativ erfolgte eine Antibiose mit einer einmaligen subkutanen Injektion von Enrofloxacin (10 mg/kg KG), sowie eine Schmerzbehandlung mit dem Opioid Buprenorphin (0,1 mg/kg KG). Schein-operierte Knockout-Tiere, bei denen kein Aortenbanding erfolgte, dienten bei jeder Versuchsreihe als Kontrolle. Nach 2 bzw. 4 Wochen, wurden die Tiere präpariert und das Herz histologisch und molekularbiologisch analysiert.

#### **6.2.7.4 Echokardiographie**

Die echokardiographischen Untersuchungen erfolgten mit dem Vevo 2100 High-Resolution Imaging System (Visual Sonics), ausgestattet mit einem 40 MHz Schallkopf und wurden von Martin Taube und Stefanie Schelenz am Max-Delbrück-Centrum durchgeführt. Initial wurden die Mäuse mit Isofluran betäubt und zur besseren Schallübertragung im Brustbereich rasiert. Das Herz wurde im B-Mode, von der parasternalen Achse aus, zweidimensional dargestellt. Die Beurteilung des Ventrikeldurchmessers und der Wanddicken erfolgte im M (Motion)-Mode, in dem ein hochfrequenter Strahl senkrecht auf das Septum und die Hinterwand gerichtet wird. Es wurden jeweils der linksventrikuläre Durchmesser, die Vorderwanddicke, die Hinterwanddicke, die endokardiale und epikardiale Fläche in der Enddiastole bestimmt und aus den gemessenen Parametern die Verkürzungsfraction und die Ejektionsfraction rechnerisch ermittelt.

#### **6.2.7.5 Elektrokardiographie (EKG)**

Die elektrische Aktivität des Herzens wurde mittels Oberflächen-EKG gemessen, dessen Ableitungen die Erregungsausbreitung und -rückbildung während der Kontraktion des Herzens beschreiben. Nach Erregungsbildung im Sinusknoten wird das elektrische Signal in die Atrien weitergeleitet, deren Erregung als P-Welle sichtbar wird. Die zeitliche Verzögerung der Erregungsausbreitung am AV-Knoten, die atrioventrikuläre Überleitungszeit, wird durch das PR-Intervall dargestellt. Der sich anschließende QRS-Komplex spiegelt die Erregungsausbreitung in den Ventrikeln wieder, die Erregungsrückbildung wird durch die T-Welle angezeigt. Die gesamte ventrikuläre Erregung, bestehend aus De- und Repolarisation wird dabei durch das QT-Intervall bezeichnet.

Die EKG-Analysen wurden an narkotisierten Tieren (2,3% Isofluran) von Stefanie Schelenz am Max-Delbrück-Centrum durchgeführt. Hierfür wurden Nadelelektroden an den Extremitäten der Tiere platziert und bipolare Ableitungen (nach Einthoven) über den Thorax für 1 min mit dem Bioverstärker Octal Bio Amp und dem PowerLab 8/30 System (ADInstruments) aufgezeichnet. Weitere Ableitungen nach Goldberg (aVR, aVL, aVF) wurden rechnerisch bestimmt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der LabChart 7 pro analysing software (ADInstruments), wobei die Dauer der P-Welle, das PR-Intervall, das QRS-Intervall, das RR-Intervall sowie das QT-Intervall

errechnet wurden. Die Frequenzkorrektur der QT-Zeit (QTc) erfolgte anschließend mit der Formel nach Bazett.

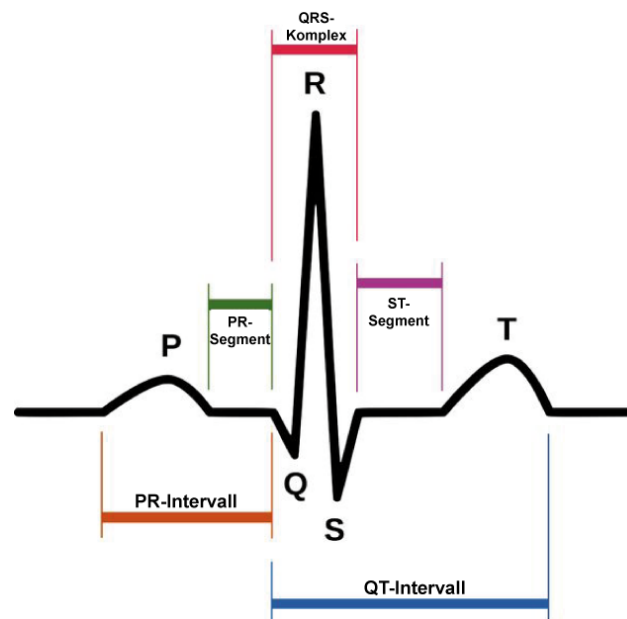


Abb. 26: Schematische Darstellung eines EKGs. (<http://pictures.doccheck.com>)

#### 6.2.7.6 EBD-Injektion

Um die zelluläre Integrität der Kardiomyozyten nach erhöhter Belastung zu analysieren, wurde den Tieren 1% EBD (Sigma-Aldrich) in PBS intraperitoneal injiziert. Evans Blue Dye ist ein ungiftiger intravitaler Farbstoff, der *in vivo* an das membranimpermeable Serumalbumin bindet. Aufgrund dessen kann er die Membran erst infolge einer Ruptur passieren. 18-24 h nach der Applikation wurden die Tiere mittels Cervikaldislokation getötet und das Herz kryoeingebettet. Die Detektion von EBD erfolgte unter dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Leica SPE) bei einer Wellenlänge von 620 nm.

#### 6.2.7.7 Präparation

Zur Präparation von Organen wurden die Tiere mittels Cervikaldislokation getötet, gewogen und der Thorax bzw. der Bauchraum freigelegt. Nach der Entnahme wurden die Organe sofort in eiskaltes PBS überführt, von Fremdmaterial gesäubert und entsprechend ihrer Verwendung weiter verarbeitet. Im Falle des Herzens erfolgte zunächst eine Gewichtsbestimmung, gefolgt von einer Querteilung des Organs in drei Teile. Die Herzspitze wurde für RNA- und Protein-Analysen, der mittlere Querschnitt

für die Paraffin- und der basale Abschnitt für die Kryoeinbettung aufgearbeitet. Anhand des ermittelten Körper- (KG) und Herzgewichtes (HG) wurde im Anschluss der Hypertrophie-Index ( $\text{HG}[\text{mg}]/\text{KG}[\text{g}]$ ) errechnet.

Die Präparation der Embryos erfolgte an Embryonaltag 13.5. Hierfür wurden die Weibchen nach dem Ansatz der Verpaarung einem täglichen „Plug Check“ unterzogen. Beim Auftreten des äußerlich sichtbaren Vaginalpfropfens kann von einer erfolgreichen Befruchtung ausgegangen und somit der Embryonaltag errechnet werden. Nach erfolgter Cervikaldislokation wurden die Uteri entnommen, die Embryonen in PBS vorsichtig herauspräpariert und anschließend für die Paraffineinbettung in 4% PFA/PBS überführt.

#### **6.2.8 Statistik**

Die statistische Signifikanz beim Mittelwertvergleich zweier Gruppen wurde mittels zweiseitigen Student's t-Test ermittelt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (standard error of the mean, SEM) angegeben. Ein  $p$ -Wert  $\leq 0,05$  wurde als signifikant gewertet und die Signifikanz wie folgt dargestellt: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .



## 7. Literaturverzeichnis

Al-Amoui, A., Norlem, L.P., Dubochet, J. 2004. Cryo-electronmicroscopy of vitreous sections of native biological cells and tissues. *J. Struct. Biol.* 148, 2004, S. 131-135.

Amagai, M., Karpati, S., Klaus-Kovtun, V., Udey, M.C., Stanley, J.R. 1997. The extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) mediates weak homophilic adhesion. *J Cell Biol.* 102, 1997, S. 402–8.

Angst, B. D., Nilles, L. A., & Green, K. J. 1990. Desmoplakin-Ii Expression Is Not Restricted to Stratified Epithelia. *Journal of Cell Science.* 97, 1990, S. 247-257.

Asimaki, A., Syrris, P., Wichter, T., Matthias, P., Saffitz, J.E., McKenna, W.J. 2007. A novel dominant mutation in plakoglobin causes arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet.* 81, 2007, S. 964-973.

Asimaki, A., Tandri, H., Huang, H., Halushka, M.K., Gautam, S., Basso, C., Thiene, G., Tsatsopoulou, A., Protonotarios, N., McKenna, W.J., Calkins, H., Saffitz J.E. 2009. A new diagnostic test for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 360, 2009, 11, S. 1075-84.

Awad, M.M., Calkins, H., Judge, D.P. 2008. Mechanisms of disease: molecular genetics of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 5, 2008, S. 258-67.

Banerjee, I., Yekkala, K., Borg, T.K., Baudino, T.A. 2006. Dynamic interactions between myocytes, fibroblasts, and extracellular matrix. *Ann N Y Acad Sci.* 1080, 2006, S. 76-84.

Basso, C., Corrado, D., Marcus, F.I., Nava, A., Thiene, G. 2009. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Lancet.* 373, 2009, S. 1289-1300.

Bauce, B., Basso, C., Rampazzo, A., Beffagna, G., Daliento, L., Frigo, G. et al. 2005. Clinical profile of four families with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by dominant desmoplakin mutations. *Eur Heart J.* 26, 2005, S. 1666–1675.

Beffagna, G. et al. 2005. Regulatory mutations in transforming growth factor-beta3 gene cause arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 1. *Cardiovasc. Res.* 65, 2005, S. 366-373.

Berkowitz, P., Hu, P., Liu, Z., Diaz, L. A., Enghild, J. J., Chua, M. P., and Rubenstein, D. S. 2005. Desmosome signaling: Inhibition of p38 MAPK prevents pemphigus vulgaris IgG induced cytoskeleton reorganization. *J. Biol. Chem.* 280, 2005, S. 23778–23784.

Berkowitz, P., Hu, P., Warren, S., Liu, Z., Diaz, L. A., and Rubenstein, D. S. 2006. p38MAPK inhibition prevents disease in pemphigus vulgaris mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 2006, S. 12855–12860.

- Bierkamp, C., McLaughlin, K.J., Schwarz, H., Huber, O. & Kemler, R. 1996. Embryonic heart and skin defects in mice lacking plakoglobin. *Dev Biol.* 180, 1996, S. 780-785.
- Boengler, K., Schulz, R., Heusch, G. 2006. Connexin 43 signalling and cardioprotection. *Heart.* 92, 2006, 12, S. 1724–1727.
- Bonne, S., Gilbert, B., Hatzfeld, M., Chen, X., Green, K. J., and van Roy, F. 2003. Defining desmosomal plakophilin-3 interactions. *J. Cell Biol.* 161, 2003, S. 403–416 .
- Borrmann, C.M, Grund, C., Kuhn, C., Hofmann, I., Pieperhoff, S., Franke, W.W. 2006. The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. II. Colocalizations of desmosomal and fascia adhaerens molecules in the intercalated disk. *Eur J Cell Biol.* 85, 2006, S. 469-85.
- Brennan, D., Hu, Y., Joubert, S., Choi, Y.W., Whitaker-Menezes, D., O'Brien, T., Uitto, J., Rodeck, U., Mahoney, M.G. 2007. Suprabasal Dsg2 expression in transgenic mouse skin confers a hyperproliferative and apoptosis-resistant phenotype to keratinocytes. *J Cell Sci.* 120, 2007, S. 758-71.
- Burdett, I.D., Sullivan, K.H. 2002. Desmosome assembly in MDCK cells: transport of precursors to the cell surface occurs by two phases of vesicular traffic and involves major changes in centrosome and Golgi location during a Ca(2+) shift. *Exp Cell Res.* 276, 2002, 2, S. 296–309.
- Campbell, K.P. 1995. Three muscular dystrophies loss of cytoskeleton–extracellular matrix linkage. *Cell.* 80, 1995, S. 675–679.
- Chen, X., Bonne, S., Hatzfeld, M., van Roy, F., and Green, K. J. 2002. . Protein binding and functional characterization of plakophilin 2. Evidence for its diverse roles in desmosomes and beta-catenin signaling. *J. Biol. Chem.* 277, 2002, S. 10512–10522.
- Chidgey, M., Brakebusch, C., Gustafsson, E., Cruchley, A., Hail, C., Kirk, S., Merritt, A., North, A., Tselepis, C., Hewitt, J., Byrne, C., Fassler, R., Garrod, D. 2001. Mice lacking desmocollin 1 show epidermal fragility accompanied by barrier defects and abnormal differentiation. *J Cell Biol.* 155, 2001, S. 821-32.
- Chitaev, N. A. et al. 1996. The binding of plakoglobin to desmosomal cadherins: Patterns of binding sites and Topogenic potential. *Journal of Cell Biology.* 133, 1996, S. 359-369 .
- Chitaev, N.A. & Troyanovsky, S.M. 1997. Direct Ca<sup>2+</sup>-dependent heterophilic interaction between desmosomal cadherins, desmoglein and desmocollin, contributes to cell-cell adhesion. *J. cell Biol.* 138, 1997, S. 193-201 .
- Choi, H. J. & Weis, W. I. 2005. Structure of the armadillo repeat domain of plakophilin 1. *Journal of Molecular Biology.* 346, 2005, S. 367-376.
- Corrado, D., Basso, C., Thiene, G. 2009. Arrhythmogenic right ventricular: an update. *Heart.* 95, 2009, S. 766-773.

Corrado, D., Thiene, G., Nava, A. et al. 1990. Sudden death in young competitive athletes. clinicopathologic correlations in 22 cases. *Am. J. Med.* 89, 1990, S. 588-596.

Cowin, P., Franke, W. W., Grund, & Kapprell, H. P. 1985. The Desmosome-Intermediate Filament complex. In G.M. Edelman & J.P. Thiery (Eds.), *The cell in contact: Adhesion and Junctions as morphogenetic determinants*. New York: Wiley and Sons . 1985, S. 427-460.

Cowin, P., Kapprell, H. P., & Franke, W. W. 1985. The Complement of Desmosomal Plaque Proteins in Different Cell-Types. *J Cell Biol.* 101, 1985, S. 1442-1454.

Cowin, P., Kapprell, H. P., Franke, W. W., Tamkun, J., & Hynes, R. O. 1986. Plakoglobin - A Protein Common to Different Kinds of Intercellular Adhering Junctions. *Cell.* 46, 1986, S. 1063-1073.

Delmar, M. and McKenna, W.J. 2010. The Cardiac Desmosome and Arrhythmogenic Cardiomyopathies: From Gene to Disease. *Circulation Research.* 107, 2010, S. 700-714 .

Delmar, M.,Duffy,H.S.,Sorgen,P.L.,Taffet,S.M.,Spray,D.C. 2004. Molecular organization and regulation of the cardiac gap junction channel Connexin43. *Cardiac Electrophysiology: from cell to bedside.* 2004, S. 66 –76.

Delmar, M.,Sorgen, P.L. 2009. Molecular organization and regulation of the cardiac gap junction channel Connexin43. *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside.* 2009, S. 85–92.

Den, Z., Cheng,X., Merched-Sauvage,M., Koch,P.J. 2006. Desmocollin 3 is required for pre-implantation development in the mouse embryo. *Journal of Cell Science.* 119, 2006, S. 482-489.

Desai, B.V., Harmon,H.M and Green, K.J. 2009. Desmosomes at a glance. *Journal of Cell Science.* 122, 2009, S. 4401-4407.

Eshkind, L., et al. 2002. Loss of desmoglein 2 suggests essential functions for early embryonic development and proliferation of embryonal stem cells. *Eur J Cell Biol.* 81, 2002, S. 592-598 .

Fidler, L.M., G.J. Wilson, F. Liu, X. Cui, S.W. Scherer, G.P. Taylor, and R.M. Hamilton. 2008. Abnormal connexin43 in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by plakophilin-2 mutations. *J Cell Mol Med.* 13, 2008, S. 4219-28.

Fleming, T. P., Butler, L., Lei, X., Collins, J., Javed, Q., Sheth, B., Stoddart, N., Wild, A., and Hay, M. 1994. Molecular maturation of cell adhesion systems during mouse early development. *Histochemistry.* 101, 1994, S. 1–7 .

Fleming, T. P., Garrod, D. R., and Elsmore, A. 1991. Desmosome biogenesis in the mouse preimplantation embryo. . *Development.* 112, 1991, S. 527–539.

Franke, W. W., Borrmann, C. M., Grund, C., Pieperhoff, S. 2006. The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. I. Molecular definition in intercalated disc of cardiomyocytes by immunoelectron microscopy of desmosomal proteins. *European journal of cell biology*. 85, 2006, S. 69-82.

Franke, W.W. et al. 1989. Molecular-Cloning and Amino-Acid Sequence of Human Plakoglobin, the Common Junctional Plaque Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86, 1989, S. 4027-4031.

Fressart, V., Duthoit, G., Donal, E. et al. 2010. Desmosomal gene analysis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy: spectrum of mutations and clinical impact in practice. *Europace*. 12, 2010, S. 861-868.

Gallicano, G.I., et al. 1998. Desmoplakin is required early in development for assembly of desmosomes and cytoskeletal linkage. *J Cell Biol*. 143, 1998, S. 2009-2022.

Garcia-Gras, E., Lombardi, R., Giocondo, M.J. et al. 2006. Suppression of canonical Wnt/beta-catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 116, 2006, S. 2012-2021.

Garrod, D., Chidgey, M. 2008. Desmosome structure, composition and function. *Biochem. et Biophys. Acta*. 1778, 2008, S. 572-587.

Garrod, D., Kimura, T.E. 2008. Hyper-adhesion: a new concept in cell-cell adhesion. *Biochem. Soc. Trans*. 36, 2008, S. 195-201.

Garrod, D.R., Merritt, A. J., & Nie, Z.X. 2002. Desmosomal cadherins. *Current Opinion in Cell Biology*. 14, 2002, S. 537-545.

Gehrmlich, K., Lambiase, P.D., Asimaki, A., Ciaccio, E.J., Ehler, E., Syrris, P., Saffitz, J.E., McKenna, W.J. 2011. A novel desmocollin-2 mutation reveals insights into the molecular link between desmosomes and gap junctions. *Heart Rhythm*. 8, 2011, S. 711-8.

Gehrmlich, K., Syrris, P., Reimann, M., Asimaki, A., Ehler, E., Evans, A., Quarta, G., Pantazis, A., Saffitz, J.E., McKenna, W.J. 2012. Molecular changes in the heart of a severe case of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by a desmoglein-2 null allele. *Cardiovasc Pathol*. 21, 2012, 4, S. 275-82.

Gehrmlich, K., Syrris, P., Peskett, E., Evans, A., Ehler, E., Asimaki, A., Anastasakis, A., Tsatsopoulou, A., Vouliotis, A.I., Stefanadis, C., Saffitz, J.E., Protonotarios, N., McKenna, W.J. 2011. Mechanistic insights into arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by desmocollin-2 mutations. *Cardiovascular Research*. 90, 2011, S. 77-87.

Gerull, B. et al. 2004. Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nat Genet*. 36, 2004, S. 1162-1164.

- Getsios, S., Huen, A. C., & Green, K. J. 2004. Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 5, 2004, S. 271-281.
- Goodenough, D.A., Goliger, J.A., Paul, D.L. 1996. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem*. 65, 1996, S. 475-502.
- Goonasinghe, A., Luan, X.-M., Hurlstone, A. and Garrod, D. 2012. Desmosomal cadherins in zebrafish epiboly and gastrulation. *BMC Dev Biol*. 12, 2012, 1.
- Grossmann, K.S., et al. 2004. Requirement of plakophilin 2 for heart morphogenesis and cardiac junction formation. *J Cell Bio*. 167, 2004, S. 149-160.
- Gumbiner, B. M. 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*. 84, 1996, S. 345-57.
- Hanakawa, Y., Amagai, M., Shirakata, Y., Sayama, K., Hashimoto, K. 2000. Different effects of dominant negative mutants of desmocollin and desmoglein on the cell-cell adhesion of keratinocytes. *J Cell Sci*. 113, 2000, S. 1803-11.
- Hatzfeld, M. 2006. Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion. *Biochim. Biophys. Acta*. 1773, 2006, S. 69-77.
- Hatzfeld, M., Haffner, C., Schulze, K., and Venzens, U. 2000. The function of plakophilin1 in desmosome assembly and actin filament organization. *J. Cell Biol*. 149, 2000, S. 209-222.
- Heuser, A., Plovie, E.R., Ellinor, P.T., Grossmann, K.S., Shin, J.T., Wichter, T., Basson, C.T., Lerman, B.B., Sasse-Klaassen, S., Thierfelder, L., MacRae, C.A., Gerull, B. 2006. Mutant desmocollin-2 causes arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet*. 79, 2006, S. 1081-1088.
- Hofmann, I., Mertens, C., Brettel, M., Nimmrich, V., Schnolzer, M., and Herrmann, H. 2003. Interaction of plakophilins with desmoplakin and intermediate filament proteins: An in vitro analysis. *J. Cell Sci*. 113, 2003, S. 2471-2483 .
- Holthöfer, B., Windoffer, R., Troyanovsky, S., Leube, R.E. 2007. Structure and function of desmosomes. *Int Rev Cytol*. 264, 2007, S. 65-163.
- Huber, O. 2003. Structure and function of desmosomal proteins and their role in development and disease. *Cell. Mol. Life Sci*. 60, 2003, S. 1872-1890.
- Hunt, D.M., Sahota, V.K., Taylor, K., Simrak, D., Hornigold, N., Arnemann, J., Wolfe, J., Buxton, R.S. 1999. Clustered cadherin genes: a sequence-ready contig of the desmosomal cadherin locus on human chromosome 18. *Genomics*. 62, 1999, S. 445-455.
- Jackson, B. W. et al. 1980. Formation of Cytoskeletal Elements During Mouse Embryogenesis - Intermediate Filaments of the Cytokeratin Type and Desmosomes in Pre-Implantation Embryos. . *Differentiation*. 17, 1980, S. 161-179.

Jackson, B. W., Grund, C., Winter, S., Franke, W. W., & Illmensee, K. 1981. Formation of Cytoskeletal Elements During Mouse Embryogenesis .2. Epithelial Differentiation and Intermediate-Sized Filaments in Early Postimplantation Embryos. *Differentiation*. 20, 1981, S. 203-216.

Jacoby, D., McKenna, W.J. 2012. Genetics of inherited cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 33, 2012, S. 296-304.

Kaplan, S.R., Gard, J.J., Protonotarios, N., Tsatsopoulou, A., Spiliopoulou, C., Anastasakis, A., Squarcioni, C.P., McKenna, W.J., Thiene, G., Basso, C., Brousse, N., Fontaine, G., Saffitz, J.E. 2004. Remodeling of myocyte gap junctions in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy due to a deletion in plakoglobin (Naxos disease). *Heart Rhythm*. 1, 2004, S. 3-11.

Kawamura, K. 1994. cDNA Cloning and Expression of A Novel Human Desmocollin. *Journal of Biological Chemistry*. 269, 1994, S. 26295-26302.

Kirchhof, P., Fabritz, L., Zwiener, M., Witt, H., Schäfers, M., Zellerhoff, S., Paul, M., Athai, T., Hiller, K.H., Baba, H.A., Breithardt, G., Ruiz, P., Wichter, T., Levkau, B. 2006. Age- and training-dependent development of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in heterozygous plakoglobin-deficient mice. *Circulation*. 114, 2006, 17, S. 1799-806.

Koch, P.J., Goldschmidt, M.D., Zimbelmann, R., Troyanovsky, R., & Franke, W.W. 1992. Complexity and Expression Patterns of the Desmosomal Cadherins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89, 1992, S. 353-357.

Koch, P.J., Mahoney, M.G., Ishikawa, H., Pulkkinen, L., Uitto, J., Shultz, L., Murphy, G.F., Whitaker-Menezes, D., Stanley, J.R. 1997. Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. *J Cell Biol*. 137, 1997, S. 1091-102.

Kolegraff, K., Nava, P., Helms, M.N., Parkos, C.A., Nusrat, A. 2011. Loss of desmocollin-2 confers a tumorigenic phenotype to colonic epithelial cells through activation of Akt/ $\beta$ -catenin signaling. *Mol Biol Cell*. 22, 2011, S. 1121-34.

Kouklis, P. D., Hutton, E., & Fuchs, E. 1994. Direct Binding between Keratin Intermediate Filaments and Desmosomal Proteins. *Journal of cell Biology*. 127, 1994, S. 1049-1060.

Li, J., Swope, D., Raess, N., Cheng, L., Muller, E.J., Radice, G.L. 2011. Cardiac Tissue-Restricted Deletion of Plakoglobin Results in Progressive Cardiomyopathy and Activation of beta-Catenin Signaling. *Mol Cell Biol*. 31, 2011, 6, S. 1134-44.

Liao, P., et al. 2001. The in vivo role of p38 MAP kinases in cardiac remodeling and restrictive cardiomyopathy. *Pnas*. 98, 2001, 21, S. 12283-8.

- Liu, P., Jenkins, N.A., Copeland, N.G. 2003. A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Res.* 13, 2003, 3, S. 476-84.
- Lombardi, R., Dong, J., Rodriguez, G. et al. 2009. Genetic fate mapping identifies second heart field progenitor cells as a source of adipocytes in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circ Res.* 104, 2009, S. 1076–1084.
- Mallat, Z., Tedgui, A., Fontaliran, F., Frank, R., Durigon, M., Fontaine, G. 1996. Evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *N Engl J Med.* 17, 1996, S. 1190-6.
- Marcozzi, C., Burdet, I.D., Buxton, R. S., Magee, A.I. 1998. Co-expression of both types of desmosomal cadherins and plakoglobin confers strong intercellular adhesion. *J. Cell. Sci.* 11, 1998, S. 495-509.
- McKoy, G., Protonotarios, N., Crosby, A. et al. 2000. Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease). *Lancet.* 355, 2000, S. 2119–2124.
- Merner, N.D., Hodgkinson, K.A., Haywood, A.F., Connors, S., French, V.M., Drenckhahn, J.D., Kupprion, C. et al. 2008. Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Type 5 Is a Fully Penetrant, Lethal Arrhythmic Disorder Caused by a Missense Mutation in the TMEM43 Gene. *J Hum Genet.* 82, 2008, S. :809-821.
- Mertens, C., Kuhn, C. & Franke, W.W. 1996. Plakophilins 2a and 2b: constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque. *J. Cell Biol.* 135, 1996, S. 1009-1025.
- Mertens, C., Kuhn, C., Moll, R., Schwetlick, I., & Franke, W. W. 1999. Desmosomal plakophilin 2 as a differentiation marker in normal and malignant tissues. *Differentiation.* 64, 1999, S. 277-290.
- Miravet, S., Piedra, J., Castano, J., Raurell, I., Franci, C., Dunach, M., and Garcia de Herreros, A. 2003. Tyrosine phosphorylation of plakoglobin causes contrary effects on its association with desmosomes and adherens junction components and modulates beta catenin-. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2003, S. 7391–7402.
- Musil, L.S., Goodenough, D.A. 1991. Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J Cell Biol.* 115, 1991, S. 1357-74.
- Nagata, M., Hiroe, M., Ishiyama, S., Nishikawa, T., Sakomura, Y., Kasanuki, H., Toyosaki, T., Marumo, F. 2000. Apoptotic cell death in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a comparative study with idiopathic sustained ventricular tachycardia. *Jpn Heart J.* 41, 2000, S. 733-41.
- Nava, P., Laukoetter, M.G., Hopkins, A.M., Laur, O., Gerner-Smidt, K., Green, K.J., Parkos, C.A., Nusrat, A. 2007. Desmoglein-2: A Novel Regulator of Apoptosis in the Intestinal Epithelium. *Mol Biol Cell.* 11, 2007, S. 4565-78.

- Nie, Z., Merritt, A., Rouhi-Parkouhi, M., Tabernero, L., Garrod, D. 2011. Membrane-impermeable cross-linking provides evidence for homophilic, isoform-specific binding of desmosomal cadherins in epithelial cells. *Journal of biological chemistry*. 286, 2011, S. 2143-21.
- Nollet, F., Kools, P., and van Roy, F. 2000. . Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *Journal of Molecular Biology*. 299, 2000, S. 551–572 .
- Norgett, E.E., Hatsell, S.J., Carvajal-Huerta, L. et al. 2000. Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair, and keratoderma. *Hum Mol Gene*. 9, 2000, S. 2761–2766.
- Nuber, U. A., Schafer, S., Schmidt, A., Koch, P. J., & Franke, W. W. 1995. The Widespread Human Desmocollin Dsc2 and Tissue-Specific Patterns of Synthesis of Various Desmocollin Subtypes. . *European Journal of Cell Biology*. 66, 1995, S. 69-74.
- O'Keefe, E. J., Erickson, H. P., & Bennett, V. 1989. Desmoplakin-I and Desmoplakin-Ii - Purification and Characterization. *Journal of Biological Chemistry*. 264, 1989, S. 8310-8318.
- Ohtsuka, M., Mizutani, A., Kikuti, Y.Y., Kulski, J.K., Sato, M., Kimura, M., Tanaka, M., Inoko, H. 2007. One-step generation of recombineering constructs by asymmetric-end ligation and negative selection. *Anal Biochem*. 360, 2007, 2, S. 306-8.
- Overduin, M., Harvey, T.S., Bagby, S., Tong, K. I., Yau, P., Takeichi, M., and Ikura, M. 1995. Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. . *Science*. 267, 1995, S. 386–389 .
- Parker, A.E. et al. 1991. . Desmosomal Glycoprotein-Ii and Glycoprotein-Iii - Cadherin-Like Junctional Molecules Generated by Alternative Splicing. *Journal of Biological Chemistry*. 266, 1991, S. 10438-10445.
- Pieperhoff, S., Franke, W.W. 2007. The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates - IV: coalescence and amalgamation of desmosomal and adhaerens junction components - late processes in mammalian heart development. *Eur J Cell Biol*. 86, 2007, S. 377-91.
- Pilichou, K., Nava, A., Basso, C., Beffagna, G., Bauce, B., Lorenzon, A., Frigo, G., Vettori, A., Valente, M., Towbin, J., Thiene, G., Danieli, G.A., Rampazzo, A. 2006. Mutations in desmoglein-2 gene are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation*. 113, 2006, S. 1171-1179.
- Pilichou, K., Remme, C.A., Basso, C., Campian, M.E., Rizzo, S., Barnett, P., Scicluna, B.P., Bauce, B., van den Hoff, M.J., de Bakker, J.M., Tan, H.L., Valente, M., Nava, A., Wilde, A.A., Moorman, A.F., Thiene, G., Bezzina, C.R. 2009. Myocyte necrosis



underlies progressive myocardial dystrophy in mouse *dsg2*-related arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Exp Med.* 206, 2009, 8, S. 1787-802.

Poteete, A.R. 2001. What makes the bacteriophage lambda Red system useful for genetic engineering: molecular mechanism and biological function. *FEMS Microbiol Lett.* 201, 2001, 1, S. 9-14.

Ramirez-Solis, R., Rivera-Perez, J., Wallace, J.D., Wims, M., Zheng, H., Bradley, A. 1992. Genomic DNA Microextraction: A Method to Screen numerous samples. *Anal. Biochem.* 201, 1992, S. 331-335.

Rampazzo, A., et al. 2002. Mutation in human desmoplakin domain binding to plakoglobin causes adominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Hum Genet.* 71, 2002, S. 1200-1206.

Rizzo, S., Lodder, E.M., Verkerk, A.O., Wolswinkel, R., Beekman, L., Pilichou, K., Basso, C., Remme, C.A., Thiene, G., Bezzina, C.R. 2012. Intercalated disc abnormalities, reduced Na<sup>+</sup> current density, and conduction slowing in desmoglein-2 mutant mice priorto cardiomyopathic changes. *Cardiovasc Res.* 95, 2012, S. 409-18.

Rizzo, S., Pilichou, K., Thiene, G., Basso, C. 2012. The changing spectrum of arrhythmogenic (right ventricular) cardiomyopathy. *Cell Tissue Res.* 348, 2012, S. 319–323.

Ruwhof, C., van der Laarse, A. 2000. Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Card. Res.* 47, 2000, S. 23-37.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual, Band 2.* s.l.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

Sanger F., Coulson A. R. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular Biology.* 93, 1975, S. 441-448.

Sato, P.Y., Musa, H., Coombs, W., Guerrero-Serna, G., Patino, G.A., Taffet, S.M., Isom, L.L., Delmar, M. 2009. Loss of plakophilin-2 expression leads to decreased sodium current and slower conduction velocity in cultured cardiac myocytes. *Circ Res.* 105, 2009, S. 523–526.

Sato, P.Y., Coombs, W., Lin, X., Nekrasova, O., Green, K.J., Isom, L.L., Taffet, S.M., Delmar, M. 2011. Interactions between ankyrin-G, Plakophilin-2, and Connexin43 at the cardiac intercalated disc. *Circ Res.* 109, 2011, S. 193-201.

Schafer, S., Koch, P. J., & Franke, W. W. 1994. Identification of the Ubiquitous Human Desmoglein, Dsg2, and the Expression Catalog of the Desmoglein Subfamily of Desmosomal Cadherins. *Experimental Cell Research.* 211, 1994, S. 391-399.

Schäfer, S., Koch, P.J., Franke, W.W. 1994. Identification of the Ubiquitous Human Desmoglein, Dsg2, and the Expression Catalog of the Desmoglein Subfamily of Desmosomal Cadherins. *Experimental Cell Research.* 211, 1994, S. 391-399.

Schmidt, A. et al. 1999. Plakophilin 3 - a novel cell-type-specific desmosomal plaque protein. *Differentiation*. 64, 1999, S. 291-236.

Schmidt, A., Langbein, L., Rode, M., Pratzel, S., Zimbelmann, R., Franke, W.W. 1997. Plakophilins 1a and b: widespread nuclear proteins recruited in specific epithelial cells as desmosomal plaque components. *Cell Tissue Research*. 290, 1997, S. 481-499 .

Simpson, M.A., Mansour, S., Ahnood, D. et al. 2009. Homozygous mutation of desmocollin-2 in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with mild palmoplantar keratoderma and woolly hair. *Cardiology*. 113, 2009, S. 28–34 .

Smith, W. 2011. Guidelines for the diagnosis and management of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Heart Lung Circ*. 20, 2011, S. 757-760.

Souders, C.A., Bowers, S.L., Baudino, T.A. 2009. Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res*. 105, 2009, 12, S. 1164-76.

Stein, M., van Veen, T.A., Hauer, R.N., de Bakker, J.M., van Rijen, H.V. 2011. A 50% reduction of excitability but not of intercellular coupling affects conduction velocity restitution and activation delay in the mouse heart. *PLoS One*. 6, 2011, 6.

Syed, S.-e.-H., Trinnaman, B., Martin, S., Major, S., Hutchinson, J. & Magee, A. I. 2002. Molecular interactions between desmosomal cadherins. *Biochem J*. 362, 2002, S. 317-27.

Thomason, H. A., Scothern, A., Mcharg ,S. & D. Garrod, D.R. 2010. Desmosomes: adhesive strength and signalling in health and disease. *Biochem. J*. 429, 2010, S. 419–433.

Tiso, N., Stephan, D.A., Nava, A., Bagattin, A., Devaney, J.M., Stanchi, F., Larderet, G., Brahmhatt,B., Rown,B.,Bauce, B.,Muriago, M., Basso, C., Thiene, G., Danieli, G.A., Rampazzo, A. 2001. Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2). *Hum Mol Genet*. 10, 2001, S. 189-194.

Troyanovsky, S.M., Eshkind, L.G., Troyanovsky, R.B., Leube, R.E., and Franke, W.W. 1993. Contributions of cytoplasmic domains of desmosomal cadherins to desmosome assembly and intermediate filament anchorage. *Cell*. 72, 1993, S. 561–574.

Troyanovsky, S.M., Troyanovsky, R.B., Eshkind, L.G., Krutovskikh, V.A., Leube, R.E., and Franke, W.W. Journal of Cell B. 1994. Identification of the plakoglobin-binding domain in desmoglein and its role in plaque assembly and intermediate filament anchorage. *Journal of Cell Biology*. 127, 1994, S. 151-160.

Wichter, T., Pual, M., Breihardt, G. 2005. Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*. 56, 2005, S. 118-125.

Witcher, L. L. et al. 1996. Desmosomal cadherin binding domains of plakoglobin. *Journal of Biological Chemistry*. 271, 1996, S. 10904-10909 .

Yu, D, Ellis H.M., Lee, E.-C, Jenkins, N.A., Copeland, N.G.and Court, D.L. 2000. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *PNAS*. 97, 2000, 11, S. 5978–5983 .

Zong, J., Zhang, D.P., Zhou, H., Bian, Z.Y., Deng, W., Dai, J., Yuan, Y., Gan, H.W., Guo, H.P., Tang, Q.Z. 2012. Baicalein protects against cardiac hypertrophy through blocking MEK-ERK1/2 signaling. *J Cell Biochem*. 2012.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog
ANF	atrial natriuretic factor
Ang II	Angiotensin II
APS	Ammoniumpersulfat
ARVC	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
AV-Knoten	Atrioventrikularknoten
BAC	bacterial artificial chromosome
BNP	brain natriuretic peptide
BSA	bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	complementary DNA
Cre	cyclization recombination
Cx43	Connexin 43
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DGC	Dystrophin-Glykoprotein-Komplex
DM	elektronendichte Mittellinie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
Dsc	Desmocollin
Dsc2 <sup>+/+</sup>	Wildtyp
Dsc2 <sup>-/-</sup>	Knockout
Dsg	Desmoglein
Dsp	Desmoplakin
E	Embryonaltag
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBD	Evans blue dye
ECL	enhanced chemiluminescence
ECM	extrazelluläre Matrix

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
EM	Elektronenmikroskop
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
EtOH	Ethanol
Fab	fragment antigen binding
FKS	fötales Kälberserum
FLP	Flippase
FRT	flp recognition target
FS	Verkürzungsfraktion
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische DNA
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	destilliertes Wasser
HE	Hämatoxylin-Eosin
HG	Herzgewicht
HRP	horseradish peroxidase
HSP	heat shock protein
IDP	innerer dichter Plaque
IF	Intermediärfilamente
IVSd	diastolische interventrikuläre Septumdicke
Kb	Kilobasen
KG	Körpergewicht
KO	Knockout
LB	Luria-Bertani
LIF	leukemia inhibitory factor
LV	linker Ventrikel
LVD	diastolischer linksventrikulärer Diameter
LVPWd	diastolische Hinterwanddicke
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MHC	myosin heavy chain
mRNA	messenger ribonucleid acid
Neo	Neomycin

NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NGS	normal goat serum
OD	optische Dichte
ODP	äußerer dichter Plaque
P	Phospho
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
PG	Plakoglobin
PI3	Phosphatidylinositol 3-kinase
Pkp	Plakophilin
PM	Plasmamembran
PV	Pemphigus vulgaris
QRT	quantitative Real-time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RV	rechter Ventrikel
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEM	standard error of the mean
SOC	super optimal broth with catabolite repression
SSC	saline sodium citrate
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
TAC	transthorakale Aortenkonstriktion
Taq	Thermus aquaticus
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline with Tween 20
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TM	transmembrane Domäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTE	Tris-Taurin-EDTA
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UV/VIS	ultraviolet-visible
Vol.	Volumen
vs	versus

---

w/v	weight per volume
WGA	wheat germ agglutinin
Wnt	wingless
WT	Wildtyp

## Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Thierfelder für die Möglichkeit danken, diese Dissertation in seiner Arbeitsgruppe am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin anfertigen zu dürfen. Ich konnte auf ein breites Methodenspektrum zurückgreifen und erlernte durch das umfangreiche wissenschaftliche Angebot des Instituts wertvolle theoretische Hintergründe.

Mein weiterer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe, die mir immer hilfsbereit zur Seite stand. In erster Linie möchte ich dabei meinem Betreuer Arnd Heuser und meinem Doktorandenkollegen Robert Zinke für ihre wissenschaftliche Unterstützung danken.

Ein besonders großes Dankeschön richtet sich an meine Kollegin und gute Freundin Manuela Magarin, die mich in jeder Hinsicht immer wieder aufgebaut und mich auf zahlreichen erholsamen Reisen begleitet hat.

Martin Taube und Stefanie Schelenz danke ich für die Durchführung und Auswertung der Echokardiographie-Analysen, die ein wesentlicher Beitrag zu meiner Arbeit waren. Insbesondere Steffi möchte ich danken, die durch ihre fröhliche, ungezwungene Art immer wieder eine willkommene Ablenkung war.

Ohne die vielseitigen Kooperationen wäre die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank an Bettina Purfürst (Elektronenmikroskopische Core facility), Dr. Boris-Alexander Jerchow (Transgenic Core facility) und an Astrid Schiche (AG Lipp) für die bereitwillige und freundliche Zusammenarbeit.

Weiterer Dank gebührt Herrn Masato Ohtsuka für die Überlassung des Recombineering-Vektors pAEF.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas Sommer für die Übernahme der universitären Betreuung danken.



## Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig erarbeitet und verfasst und gemäß §7 Absatz 3 der Promotionsordnung keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet zu haben. Diese Dissertation wurde keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegt. Die Bestimmungen der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I sind mir bekannt.

Berlin, den 06.05.2013

---

Ute Rimpler